

神経様細胞の凍結・融解特性に関する基礎的研究

著者	植村 真
発行年	2014
学位授与年度	平成25年度
学位授与番号	17104甲生工第217号
URL	http://hdl.handle.net/10228/5335

博士学位論文

神経様細胞の凍結・融解特性に 関する基礎的研究

植村 真

目 次

記号・略語表.....	V
第1章 序論.....	1
1.1 はじめに.....	2
1.2 細胞の凍結.....	3
1.2.1 凍結様式.....	3
1.2.2 凍結による細胞損傷.....	3
1.3 凍結保存.....	7
1.3.1 凍結保護物質.....	7
1.3.2 凍結保存の手法.....	8
1.4 神経細胞の凍結保存.....	9
1.4.1 懸濁状態の神経細胞の凍結保存.....	9
1.4.1.1 初代神経細胞の凍結保存.....	9
1.4.1.2 神経幹細胞の凍結保存.....	12
1.4.2 神経ネットワークの凍結保存.....	13
1.5 本研究の目的と着眼点.....	15
1.6 本論文の構成.....	17
第2章 未分化神経様細胞の増殖・分化特性とその反応速度論的モデル....	18
2.1 緒言.....	19
2.2 実験材料および方法.....	21
2.2.1 実験材料.....	21
2.2.2 PC12 細胞の継代培養と分化誘導.....	21
2.2.3 細胞の撮影および細胞数の計測法.....	24
2.3 PC12 細胞の増殖・分化特性.....	27
2.3.1 実験結果.....	27
2.3.1.1 神経分化を伴わない場合 (NGF 無添加の場合) の未分化細胞数の時間変化.....	27
2.3.1.2 神経分化を伴う場合 (NGF 添加の場合) の各細胞数の時間変化.....	27
2.3.2 考察.....	33
2.3.2.1 神経分化を伴わない場合の未分化細胞の増殖特性.....	33
2.3.2.2 神経分化を伴う場合の未分化細胞の増殖と分化の特性.....	33

2.4	細胞増殖と分化の数学モデル.....	35
2.4.1	反応速度論的モデル化.....	35
2.4.1.1	モデル化と仮定.....	35
2.4.1.2	定式化.....	35
2.4.1.3	基礎方程式と初期条件.....	35
2.4.1.4	解析解.....	39
2.4.2	モデル特性.....	39
2.4.2.1	パラメータスタディ.....	39
2.4.2.2	モデル特性の結果.....	39
2.4.2.3	考察.....	44
2.4.2.3.1	各細胞数の時間変化に対する K の影響.....	44
2.4.2.3.2	各細胞数の時間変化の比較.....	44
2.5	PC12 細胞の増殖と分化へのモデルの適用.....	48
2.5.1	逆問題解析によるモデル定数の決定の方法.....	48
2.5.2	逆問題解析の結果.....	48
2.5.3	考察.....	51
2.5.3.1	実験値とモデルによる計算値の比較.....	51
2.5.3.2	細胞増殖と分化の速度定数の血清濃度依存性.....	51
2.6	まとめ.....	54
第3章	生理食塩水中における神経様細胞の凍結・融解特性.....	55
3.1	緒言.....	56
3.2	実験材料およびその準備.....	59
3.2.1	実験材料.....	59
3.2.2	PC12 細胞の継代培養と分化誘導.....	59
3.3	実験装置および方法.....	63
3.3.1	凍結・融解のための低温ステージ.....	63
3.3.2	凍結挙動の観察.....	63
3.3.3	凍結・融解後の細胞の形態変化の観察と生存率の測定.....	66
3.3.3.1	方向性凝固ステージを用いる場合.....	66
3.3.3.2	一様温度分布ステージを用いる場合.....	69
3.3.4	浸透圧ストレスによる細胞の形態変化の観察.....	69
3.3.5	免疫細胞化学染色による細胞骨格の観察.....	72
3.3.6	統計的解析.....	74

3.4	実験結果.....	75
3.4.1	凍結挙動.....	75
3.4.1.1	細胞内凍結を伴わない場合.....	75
3.4.1.2	細胞内凍結を伴う場合.....	75
3.4.2	凍結・融解後の細胞の形態変化.....	81
3.4.3	浸透圧ストレスによる細胞の形態変化.....	91
3.4.4	凍結・融解後の細胞の生存率.....	98
3.5	考察.....	107
3.5.1	細胞外凍結挙動と細胞損傷.....	107
3.5.2	細胞内凍結挙動と細胞損傷.....	107
3.5.3	細胞内氷結晶の発生位置と伝播.....	108
3.5.4	凍結・融解後の神経突起の形態変化.....	109
3.5.5	浸透圧ストレスによる形態変化.....	110
3.5.6	神経突起の形態変化に関する従来の研究.....	110
3.5.7	凍結・融解後の生存性と形態変化の冷却条件に対する依存性.....	110
3.6	まとめ.....	112
第4章	神経様細胞の凍結・融解特性に対する凍結保護物質の効果.....	114
4.1	緒言.....	115
4.2	実験材料およびその準備.....	116
4.2.1	実験材料.....	116
4.2.2	PC12細胞の継代培養と分化誘導.....	116
4.3	実験装置および方法.....	117
4.3.1	凍結保護物質.....	117
4.3.2	凍結挙動の観察.....	117
4.3.3	凍結・融解後の細胞の形態変化の観察と生存率の測定.....	117
4.3.4	免疫細胞化学染色による細胞骨格の観察.....	118
4.3.5	統計的解析.....	118
4.4	実験結果.....	120
4.4.1	凍結挙動.....	120
4.4.1.1	細胞内凍結を伴わない場合.....	120
4.4.1.2	細胞内凍結を伴う場合.....	120
4.4.2	凍結・融解後の細胞の形態変化.....	120
4.4.3	凍結・融解後の細胞の生存率.....	135

4.5	考察.....	137
4.5.1	凍結挙動と細胞損傷.....	137
4.5.2	凍結・融解後の細胞の形態変化.....	137
4.5.3	凍結・融解後の細胞の生存性.....	138
4.5.4	未分化型 PC12 細胞の凍結・融解後の生存性との比較.....	138
4.5.5	神経ネットワークの凍結保存後の生存性に関する従来の研究との比較.....	139
4.6	まとめ.....	140
第 5 章	結論.....	141
付録.....		付 1
A.	細胞培養に関する主な装置.....	付 2
B.	ホログラフィー顕微鏡.....	付 7
C.	温度校正の詳細.....	付 10
D.	神経線維の凍結保存.....	付 27
参考文献.....		R1
第 1 章.....		R1
第 2 章.....		R6
第 3 章.....		R9
第 4 章.....		R13
付録.....		R14

謝辞

記 号

C : 血清濃度 (等量の牛胎児血清と馬血清の混合物の培地に対する混合体積割合),
 $v/v\%$

d_1 : 数珠状部間の凍結前の太さ, μm

d_2 : 数珠状部の凍結前の太さ, μm

d_B : 数珠状部の太さ, μm

d_{NB} : 非数珠状部 (数珠状部間) の太さ, μm

G : 温度勾配, $^{\circ}\text{C}/\text{mm}$

G_s : 設定温度勾配, $^{\circ}\text{C}/\text{mm}$

G_{tc} : 熱電対によって計測した温度勾配, $^{\circ}\text{C}/\text{mm}$

H : 冷却速度, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

H_s : 設定冷却速度, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

H_{tc} : 熱電対によって計測した冷却速度, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

J_1 : 未分化細胞の無次元増殖速さ $j_1 / (k_1 \cdot N_{10}) = \eta_1$

J_2 : 未分化細胞の無次元分化速さ $j_2 / (k_1 \cdot N_{10}) = K \cdot \eta_1$

$J_1 - J_2$: 未分化細胞の正味の無次元増加速さ

j_1 : 未分化細胞の増殖速さ $k_1 \cdot N_1$, $1/\text{day}$

j_2 : 未分化細胞の分化速さ $k_2 \cdot N_1$, $1/\text{day}$

K : 無次元速度定数 k_2/k_1

k_1 : 未分化細胞の増殖の速度定数, $1/\text{day}$

k_2 : 未分化細胞の分化の速度定数, $1/\text{day}$

k_3 : 未分化細胞の死滅の速度定数, $1/\text{day}$

k_4 : 分化細胞の死滅の速度定数, $1/\text{day}$

L : 凍結前に対する凍結・融解後の神経突起長

N : 凍結・融解後の神経突起 $100\mu\text{m}$ 当たりの数珠数, $\text{beads}/100\mu\text{m}$

N_1 : 未分化細胞の生細胞数

N_2 : 分化細胞の生細胞数

N_3 : 未分化細胞の死細胞数

N_4 : 分化細胞の死細胞数

N_{10} : 未分化の生細胞数の初期値 $N_1(0)$

N_t : 全生細胞数 $N_1 + N_2$

t : 培養時間, または, 分化誘導開始後の経過時間, days

\tilde{t} : 無次元時間 $k_1 \cdot t$

$\tilde{t}_c : \eta_1 = \eta_2$ となる $\tilde{t} = \{1/(1-K)\} \cdot \ln\{K/(2K-1)\}$

T : 試料温度 , °C

T_H : 高温側温度 , °C

T_{Hs} : 設定高温側温度 , °C

T_L : 最低到達温度 , °C

T_{Ls} : 設定最低到達温度 , °C

T_{Ltc} : 熱電対によって計測した最低到達温度 , °C

T_s : 設定温度 , °C

T_{tc} : 熱電対によって計測した温度, °C

V : 試料の移動速度 , mm/min

W : 加温速度 , °C/min

W_s : 設定加温速度 , °C/min

W_{tc} : 熱電対によって計測した加温速度 , °C/min

γ : 全生細胞数に対する分化生細胞数の割合 (細胞の分化率) $N_2/N_t = \eta_2/\eta_t$

$\gamma/t \rightarrow \infty$: 細胞の分化率の漸近値

ΔT : 氷結晶先端に対する画像中心の温度 , °C

Δx : 氷結晶先端から画像中心までの距離 (高温側を正とする) , mm

η : 生存率 (凍結・融解後の全細胞数に対する生細胞数の割合)

η_1 : 未分化細胞の生細胞数割合 (無次元細胞数) N_1/N_{10}

η_2 : 分化細胞の生細胞数割合 (無次元細胞数) N_2/N_{10}

η_3 : 未分化細胞の死細胞数割合 (無次元細胞数) N_3/N_{10}

η_4 : 分化細胞の死細胞数割合 (無次元細胞数) N_4/N_{10}

η_t : 全生細胞数割合 (無次元細胞数) $N_t/N_{10} = \eta_1 + \eta_2$

略 語

CB : Cell body (細胞体)

D : Dead cell (死細胞)

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DSS : Directional solidification stage (方向性凝固ステージ)

FBS : Fetal Bovine Serum (牛胎児血清)

GCS : Glass coverslip (ガラスカバースリップ)

HS : Horse Serum (馬血清)

IC : Ice crystal (氷結晶)

IIF : Intracellular ice formation (細胞内氷形成)

L : Living cell (生細胞)

M : Medium (培養液)

M+DMSO : 10v/v%DMSO を添加した分化誘導時の培養液

MEM : Minimum essential medium

NGF : Nerve Growth Factor (神経成長因子)

NR : Neurite (神経突起)

PBS : Phosphate Buffered Saline (リン酸緩衝生理食塩水)

PCS : Plastic coverslip (プラスチックカバースリップ)

PI : Propidium Iodide

PS: Physiological saline (生理食塩水)

PS+DMSO : 10v/v%DMSO を添加した生理食塩水

UTDS : Uniform temperature distribution stage (一様温度分布ステージ)

第 1 章

序 論

1.1 はじめに

本章では、序論として、本研究の背景や目的などについて述べる。まず、「1.2」節で、本研究を理解する上で必要な基礎的事項である、細胞の凍結について、細胞の凍結過程の画像例を示しつつ解説する。細胞の凍結様式は、氷結晶が細胞内に生じる細胞内凍結と、細胞外にのみ生じる細胞外凍結に分けられ、両者は凍結の機構が異なり、凍結の条件、特に冷却速度によって決まることが多い（「1.2.1」項）。この凍結様式によって、細胞損傷のメカニズムも異なり、細胞外凍結では溶液効果や細胞外の氷結晶からの機械的ストレスが主な損傷原因であるのに対し、細胞内凍結では細胞内の氷結晶からの機械的ストレスによる損傷が主である（「1.2.2」項）。

このような、生体に対する凍結には、破壊と保存の2つの効果があり、本研究では、後者の応用である凍結保存を主な目的とするため、その基礎的事項について「1.3」節で解説する。凍結保存は、医療、農業、創薬などの幅広い分野で用いられているが、凍結・融解による損傷や保存のメカニズムは必ずしも十分には解明されておらず、現状における凍結保存の対象や条件は限定的である。凍結保存後の生存性を高めるためには、凍結保護物質の添加が必須であり、これらの種類や性質についても概説する（「1.3.1」項）。凍結保存には、現在、緩速凍結保存とガラス化保存の2つのアプローチがあり、これらの方法についても簡単に説明する（「1.3.2」項）。

本研究では、上記の凍結保存を、神経細胞に適用するため、これに関する従来の研究と問題点について、「1.4」節で説明する。神経細胞の凍結保存は、懸濁状態での保存（「1.4.1」項）と、ネットワークを形成した状態での保存（「1.4.2」項）に大別される。創薬時の薬剤スクリーニングでは、現在、新鮮、または、凍結保存された神経細胞の懸濁液や、新鮮な神経組織の切片が用いられているが、懸濁状態の神経細胞は、融解後に分化誘導する必要があるため、準備が煩雑である。神経ネットワークを形成した細胞や組織を、そのままの状態での凍結保存が出来れば、神経細胞を用いたスクリーニングの大幅な効率化が実現できると考えられるが、このような凍結保存については未解明な点が多く、未だ実用化されていない。

以上の背景に基づいて、本研究の着眼点と目的を「1.5」節で述べる。本研究では、神経ネットワーク形成に必要な神経突起を有する神経細胞の凍結に関する基礎的特性を理解することを目的とし、基質に付着した神経様細胞に対する凍結実験を行う。

最後に、「1.6」節で本論文の構成について述べる。

1.2 細胞の凍結

1.2.1 凍結様式

細胞の凍結様式は、凍結が細胞内で起きる細胞内凍結と、細胞外で起きる細胞外凍結に分けられる。両者は凍結の機構が異なり、凍結の条件、特に冷却速度によって決まることが多い^{(1.1)(1.2)}。

比較的低い冷却速度で細胞懸濁液を冷却すると、多くの場合、まず細胞の外側の水溶液が凍結する。冷却が進むにつれ、細胞外の氷結晶が成長するに従って、細胞外液中の溶質濃度が増加し、細胞内外に浸透圧差が生じるため、細胞は脱水・収縮される。溶質全ての共融点以下まで温度が低下すると、細胞内では溶質と飽和した水の混合物の凝固が起こり凍結は完了する。以上の現象が細胞外凍結であり、一例として、ニチニチソウの柔細胞から細胞壁（主成分：セルロース）を取り除いたプロトプラストの緩速凍結の挙動を Fig. 1.1a に示す。矢印で示すプロトプラストの形態は、細胞外の氷結晶に囲まれる前の -0.8°C では明瞭だが、 -4.5°C では、脱水・収縮のため不明瞭になっている。このような細胞外凍結による脱水速度は、細胞の種類や状態による膜の透過性の差や、細胞の大小による体積対表面積の比などによって左右される。

これに対して、冷却速度が比較的高い場合には、細胞からの脱水が進まず、残存水分が多いうちに試料温度が低下し、過冷却が蓄積し、その解除により細胞内凍結を起こす。細胞内に氷結晶が出来ると、細胞内を透過する光が散乱、減衰され、細胞は暗化（フラッシング）する。一例として、ニチニチソウの柔細胞のプロトプラストでは、比較的に早い冷却速度（ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ）で凍結した場合、 -20.2°C において細胞内凍結し、暗化が生じている（Fig. 1.1b）。また、細胞内凍結後は、細胞は、収縮・変形をきたすことなく、全体の形態を維持する。細胞内凍結が生じる冷却速度は、細胞の体積に対する表面積の比と、その温度における細胞膜固有の透過性に依存する。

1.2.2 凍結による細胞損傷

凍結・融解後の細胞の損傷は、凍結の際の条件や細胞の種類によって質的・量的な差があるが、生存率の冷却速度依存性を一般化すると Fig. 1.2 のような N 字曲線となる^(1.1)。

冷却速度が比較的に遅い、A における生存率の低下は、細胞外凍結に起因する。細胞外凍結によって起こる細胞損傷の機序については、細胞膜脂質が濃縮塩により一部分解されることによるという塩害説^(1.3)や、脱水による細胞の収縮が原

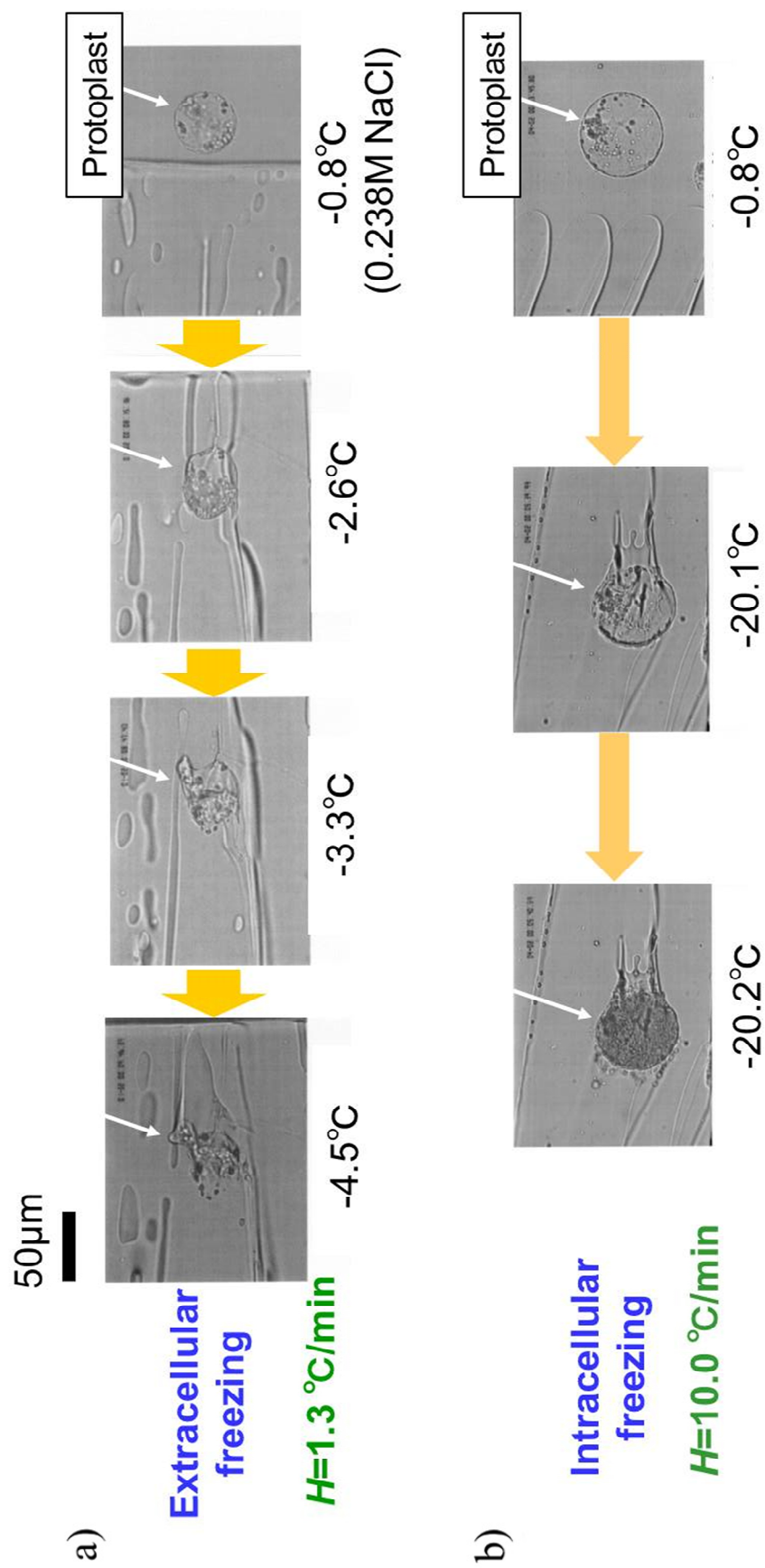


Fig. 1.1 Two types of freezing patterns of protoplast of *Catharanthus roseus* L

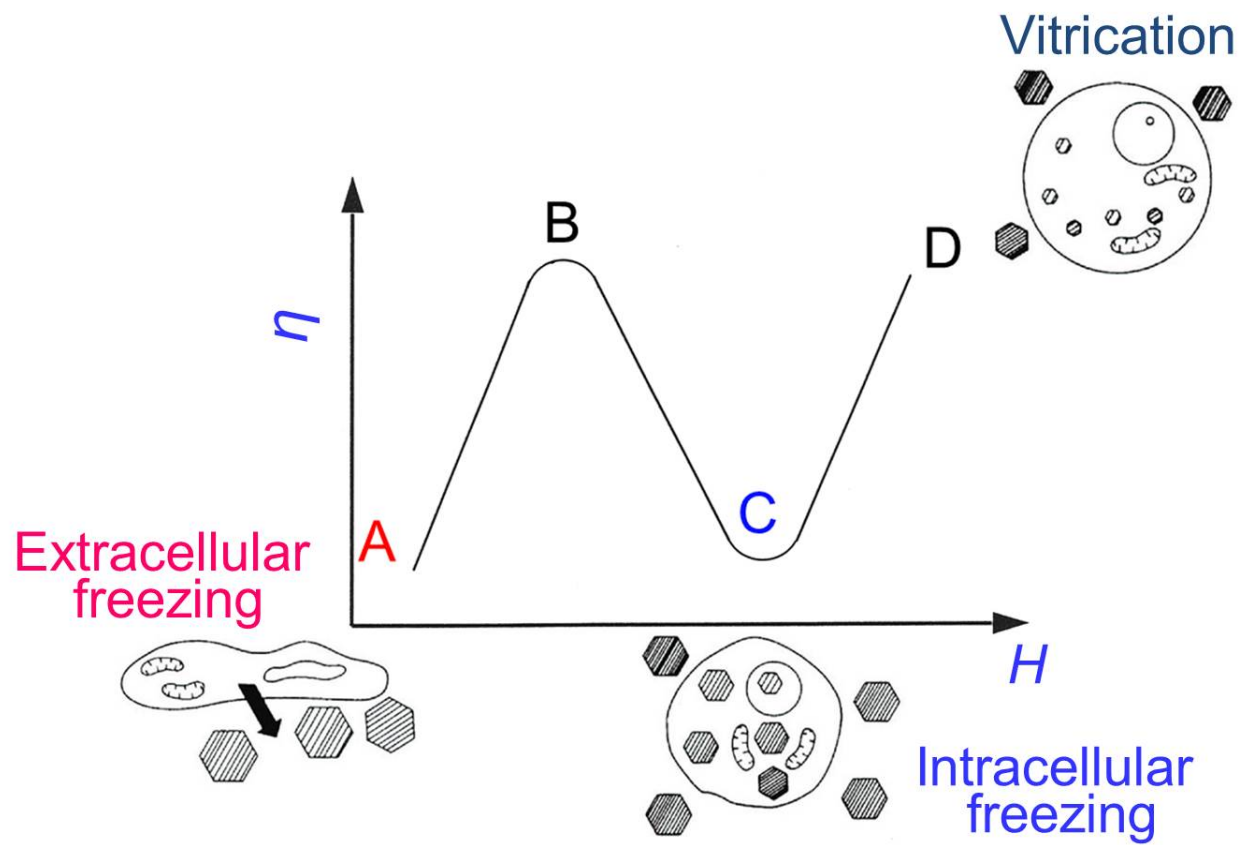


Fig. 1.2 Conceptual diagram for relation between cooling rate and viability

因であるという最小容積説^(1.4)がある．塩害説や最小容積説における，細胞外の水溶液の濃縮が原因となる効果は，溶液効果と呼ばれる．また，細胞間あるいは細胞と氷結晶間の機械的な作用により損傷をうけるという機械的ストレス説^{(1.5)(1.6)}もある．

冷却速度が比較的高い，Cにおける生存率の低下は，細胞内凍結に起因する．これは，主に，細胞内氷結晶によって細胞内小器官や細胞膜が破壊されることによると解釈されている．

生存率は，AとCの中間的な冷却速度，すなわち最適冷却速度Bで高くなる．この速度では，細胞外凍結によるストレスに曝される時間が比較的短く，一方，細胞内凍結を起こすにはやや遅いため，生存率が高くなると考えられる．

さらにCを越えてDのように極端に冷却速度の大きい冷却速度では，細胞内氷結晶ができては極めて微細であるか，あるいはほとんど氷結晶を作らずに固化するガラス化状態であるため，細胞は損傷を受けないと考えられる．ただし，この速度では，実際上ごく少数の細胞しか凍結することができない．

1.3 凍結保存

細胞や組織などを、生命機能を損なわず保存する技術の確立は、医療や農業などの幅広い分野で待望されている。医療分野では、患者の細胞を保存しておくことが出来れば、将来的にその細胞を患者自身または他人が移植や生殖などに利用することが出来る。農業分野では、家畜の生殖細胞などの保存は、畜産の効率化に資する。また、実験動物の生殖細胞や、作物の胚・分裂組織などを保存することにより、系統保存が可能になる。系統保存により、種の多様性が維持され、品種改良や、乱獲や環境の変化によって減少した品種の補充が効率化する。創薬時の薬・毒物スクリーニングなどを含む、細胞を用いた科学研究においても、実験材料である細胞の準備の効率化、同一の個体由来の細胞を使った実験の反復などに役立つ。

細胞や組織を生きたまま保存する方法には、継代培養、低温保存、凍結保存などがある。継代培養による細胞の維持においては、多大な時間が必要とされ、継代過程において遺伝子の変異が生じてしまうリスクがある。低温保存では、数日から数週間、良好に保存され得るが、より長期間の保存のためには、凍結保存が必須である。

細胞や組織の凍結・融解後の生存性は、当該生体材料の種類、冷却速度、加温速度、保存温度、凍結保護物質の種類と濃度などの条件に依存することが知られている^{(1.7)(1.8)}。これらの因子によって、氷結晶の形態、細胞の挙動、氷結晶と細胞の相互作用などの凍結・融解挙動が変化し、最終的に凍結・融解後の細胞の生存性が決定する。しかし、その損傷や保存のメカニズムは必ずしも十分には解明されておらず、現状における凍結保存の対象や条件は限定的であり^{(1.9)(1.10)}、それらの拡大のためには、種々の生体材料の凍結・融解挙動と融解後の生存性との関連性について、より詳細な情報を得ることが重要である^{(1.11)(1.12)}。

1.3.1 凍結保護物質

凍結保存後の生存性は、最適な冷却と加温の速度を選択することによって高まるが、凍結保護物質なしでは基本的に非常に低くなりやすい。凍結保護物質は、凍結前に細胞の懸濁液に添加すると、添加しない場合よりも、融解後の細胞の生存性が高まるような薬剤であり、一般には細胞膜を透過できるものとできないものとの二つのグループに大別される。前者のグループに属するものが細胞膜透過型凍結保護物質（DMSO、グリセリン、種々のグリコールやアミド類など）で、後者のグループに属するものが細胞膜非透過型凍結保護物質（糖類、

デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルピロリドンなど）と呼ばれるものである。

細胞膜透過型凍結保護物質の共通性は、低分子であること、低温においても水溶性が高く高濃度に濃縮可能で、薬害が少なく、しかも細胞内に透過しうることにある^(1,2)。このような物質は、その束一性により溶液の氷点を効果的に下げ、各凍結温度での氷晶形成量を減らし、細胞内外の塩濃度の濃縮を抑える。細胞膜非透過型凍結保護物質の作用機序としては、凝固点降下による細胞外の塩濃度の濃縮の抑制、細胞膜の保護、水の構造変化などの説があるが、いずれも完全な説明は出来ていない。保護効果を示す非透過型凍結保護物質は、共通して、水に対する溶解度が高く、低温でも析出せずに濃縮する。

1.3.2 凍結保存の手法

細胞や組織を効果的に凍結保存するには、現在、緩速凍結保存とガラス化保存の2つのアプローチがある。近年の凍結保存研究は、主に、緩速凍結保存法の改良と、ガラス化保存法の発展に主眼が置かれている。

緩速凍結保存では、試料を比較的低濃度の凍結保護物質に平衡させ、Fig. 1.2のBの状態に凍結させることを目標とする。本方法では凍結保護物質の濃度をそれほど高くする必要がないため、それによる毒性が小さく、その添加や除去における浸透圧ストレスも小さい。また、冷却速度も遅いため、サンプルサイズが比較的大きくても、目的の冷却速度を達成することが可能であり、血球^(1,13)、精子^(1,14)、胚^(1,15)、骨髄^(1,16)、皮膚^(1,17)などの細胞・組織に対して、既にある程度実用化されている。

ガラス化保存法では、試料を高濃度の凍結保護物質に平衡させ、急速に冷却し、Fig. 1.2のDの状態、すなわち、細胞の内と外のいずれにも氷結晶を生じさせず、試料全体をガラス化させる。サイズの大きなサンプルの場合、冷却速度・融解速度を十分に速くすることができないこと、その分凍結保護物質の濃度を上昇させるためその毒性が増すこと、試料内の物質移動速度が遅く凍結保護物質の試料への浸透や試料からの除去が難しいことなどから、未だ安定した成功例は報告されていない。一方、サイズが小さなサンプルに対しては、冷却速度を十分速く、保護物質の濃度を比較的低く抑えることができるため、胚^(1,15)などの細胞において既にある程度実用化されている。

1.4 神経細胞の凍結保存

神経細胞も、他の細胞と同様に、医療や創薬などの分野で凍結保存法の確立が切望されている。神経細胞の基本的な特徴としては、Fig. 1.3 で右側の位相差画像に示すように、中心部の細胞体から多数の細長い神経突起が伸びる構造を持つ。この神経突起を介して神経細胞同士が接続し、電気的な情報伝達を行う神経ネットワークが形成される。神経ネットワークによって、生体における種々の重要な機能が制御されるため、神経細胞は薬剤や毒物のターゲット細胞としても重要である。また、神経細胞は増殖能が低く、得られる細胞数が十分でないことが多いため、凍結保存の必要性が高い。

神経細胞の凍結保存に関しては、再生医療における細胞移植療法や創薬時の薬・毒物スクリーニングにおける細胞準備の効率化などを目的とし、これまで主に懸濁液の状態の神経突起を持たない細胞を対象に研究されてきた。この種の細胞には、未分化状態で、まだ神経突起を伸長させていない神経幹細胞などの細胞 (Fig. 1.3a) や、分化後に懸濁によって神経突起が切断された細胞 (Fig. 1.3b) などが含まれる。しかし、これらの細胞の凍結保存後の品質は、必ずしも十分ではなく、移植医療用としては未だ用いられていない。薬・毒物スクリーニングなどでは、既にある程度実用化されているが、懸濁状態の神経細胞は、実験に使用する前に、分化誘導・神経突起伸長・神経ネットワーク形成の過程が必要となり煩雑である。一方、ネットワークを形成した細胞群を、そのままの状態ですべて凍結保存が出来れば、神経細胞 (Fig. 1.3c) や神経組織 (Fig. 1.3d) を用いたスクリーニングの大幅な効率化が実現できると考えられる。

以下、懸濁状態の神経細胞の凍結保存に関する従来の研究を「1.4.1」項で、神経ネットワークの凍結保存に関する従来の研究を「1.4.2」項で紹介する。なお、神経細胞の凍結保存に関連して、凍結保存された神経線維（軸索の束）は、融解後の移植によって、*in vivo* で欠損した神経線維の再生（再伸長）の補助に利用可能である^{(1.18)(1.19)}が、本研究との関わりが少ないため、付録で述べる。

1.4.1 懸濁状態の神経細胞の凍結保存

1.4.1.1 初代神経細胞の凍結保存

初代神経細胞の凍結保存において、比較的良好な成果が得られた例の多くは、動物種に依らず、7~10v/v%のDMSOを添加した溶液中で、冷却速度が $H \sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の緩速凍結保存を行っている^(1.20)。冷却速度と凍結保存後の細胞の品質の関係について、ラットの大脳由来神経細胞では、融解後の生存率は、 $H = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ または $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では減少し、 $H = 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では0となった^(1.21)。ヒト胎児腹側中

脳組織細胞では、 $H = 0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で凍結保存し、融解後の生細胞の神経伝達物質含有量などが、コントロールとほぼ同等であることが報告されている^(1.22)。以上のような緩速凍結保存において、加温速度に関しては、急速加温（ 37°C のウォーターバスに 30~40 秒浸漬）の方が、緩速加温（室温に 5~7 分静置）よりも生存性が良いことが示されている^(1.21)。

凍結保護物質の種類と濃度に関しては、これまで多くの検討がなされており、DMSO は最も広く使用されている。ラット胎児の脳皮質と脳幹由来神経細胞において、2~4v/v% の DMSO では 10v/v% よりも生存性が低下し^(1.23)、牛胎児小脳皮質と海馬由来神経細胞でも、4v/v% または 8v/v% の DMSO では 10v/v% よりも生存性が低下することが報告された^{(1.24)(1.25)}。また、ラット^(1.21)、ウシ^(1.25)、ヒト^(1.26)の初代神経細胞で、15~20v/v% 以上の DMSO では生存率が低下するという報告がある。多くの研究では、浸透圧ストレスを軽減するため、DMSO は徐々に添加しているが、ワンステップで 10v/v% DMSO に浸漬しても、保護物質に対する曝露時間が減少し、比較的良好な生存性を得られることが、ブタ胎児中脳由来神経細胞で報告されている^(1.27)。DMSO の除去に関しては、生存性に対する影響が大きい事が示されており、ワンステップでの除去では、多段階の希釈による除去と比べて、27~39% 生存性が落ちることが、ヒト胎児の中脳や線条体由来神経細胞などにおいて報告されている^(1.28)。

他の凍結保護物質で初代神経細胞の凍結保存研究に用いられているものの一つとして、グリセリンがあるが、ラット^(1.29)とヒト^(1.26)の初代神経細胞において調べられている範囲では、DMSO と比較して融解後の生存性は低い。一方、スクロースと組み合わせたプロパノール溶液下での凍結保存では、ヒトの胎児腹側中脳由来神経細胞において、DMSO に匹敵する生存性が得られている^(1.30)。細胞膜非透過型凍結保護物質の使用例としては、7~21w/v% のポリビニルピロリドン単独の溶液で凍結保存された場合に、ラット胎児大脳由来神経細胞において、生存性が非常に低くなるという報告がある^(1.21)。胎児ラット中脳由来神経細胞に対して、0.1w/v% メチルセルロースを用いた凍結保存では、移植後の移植片の生存性は 0 だったが、10v/v% DMSO と組み合わせると、DMSO 単体の場合よりも生存性が上がった^(1.31)。しかし、*in vitro* における生存性は、0.1w/v% のメチルセルロースと 10v/v% DMSO を組み合わせても、上昇しないという報告^(1.32)もある。

約 10v/v% DMSO 中で緩速凍結保存し、融解後に色素排除能や残存細胞数によって生存率を計測したとする報告は多く、その結果にはかなりばらつきがあるものの、生存率は 10~90% 程度^{(1.30)(1.33-1.35)}であり、移植後の移植片のサイズはコントロールに対して、概して小さくなる^{(1.23)(1.34)(1.36)(1.37)}。

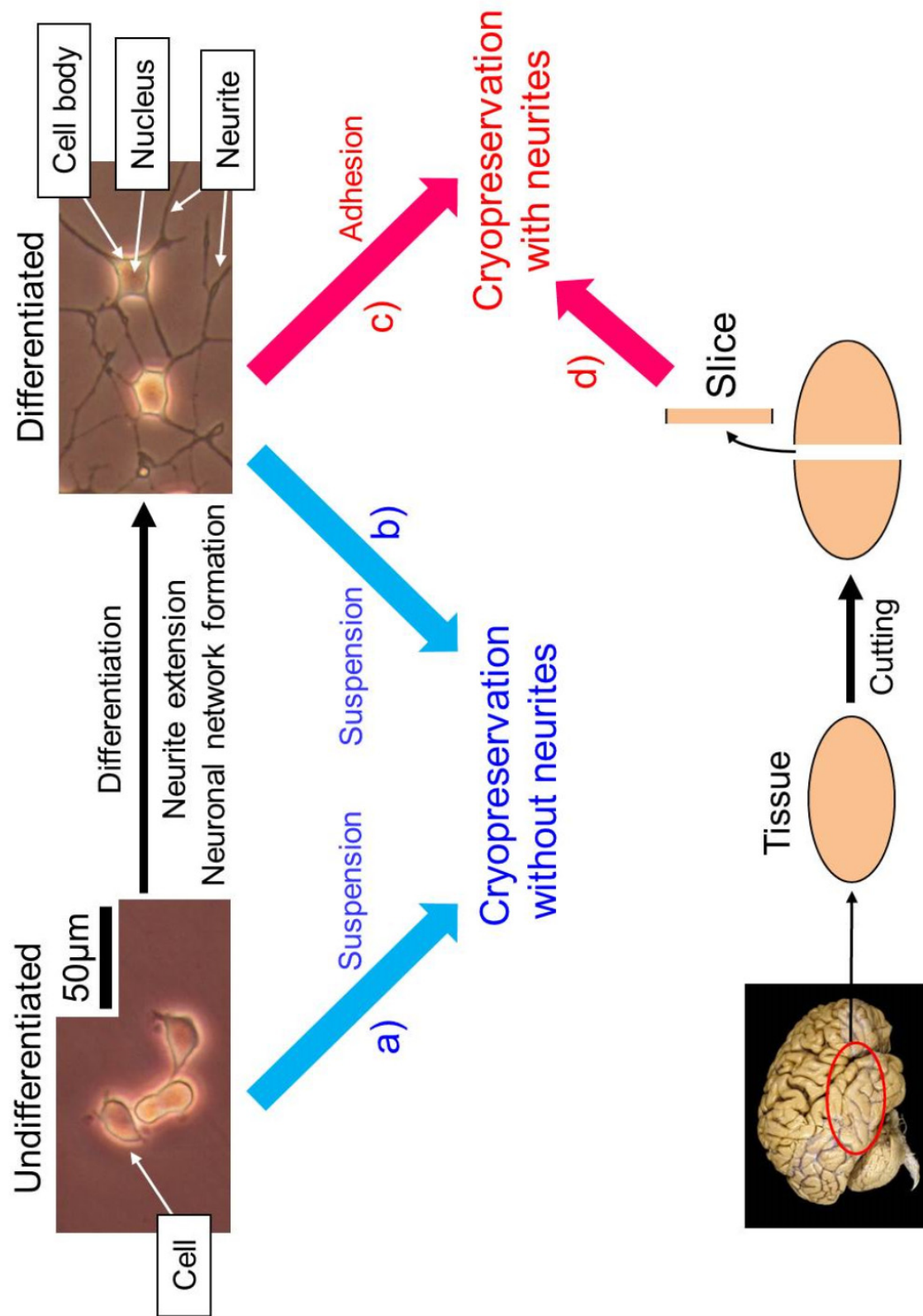


Fig. 1.3 Cryopreservation of nerve cells

凍結保存された中脳由来神経細胞は、融解後の培養状態（ラット^(1.38)、サル^(1.35)、ヒト^(1.30)）または移植後の移植片（ヒト^(1.39)、ブタ^(1.27)）において、ドーパミン神経細胞への分化能を維持することが報告されている。ドーパミン神経細胞の割合は、非凍結の場合と同等であるという報告^{(1.28)(1.34)}があるが、40%程度に減少した例もある^(1.33)。パーキンソン病モデルラットに対して、凍結保存したヒト^(1.33)、ブタ^(1.27)、ラット^(1.34)由来の初代神経細胞を移植したところ、回転行動が改善し、非凍結の場合と同等まで回復する場合もあったが、一方であまり改善しない場合もあった^{(1.32)(1.39)}。凍結保存されたヒト胎児中脳由来神経細胞をパーキンソン病の患者へ移植する臨床研究では、4人中3人にわずかな臨床的改善がみられたが、4人目の患者は、移植から4か月後に死亡し、移植片中にドーパミン神経細胞は認められなかった^(1.40)。一方、非凍結の細胞を移植されたグループでは、全員に大きな改善がみられた^{(1.41)(1.42)}。

1.4.1.2 神経幹細胞の凍結保存

初代神経細胞は、その供給量が少ないという問題があるが、これに対するアプローチの一つとして、神経組織中に含まれる神経幹細胞を *in vitro* で培養・増殖させる方法がある。初代神経組織から取り出した神経幹細胞を浮遊状態で培養すると、ニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を形成する^(1.43)。このようにして増殖させたラット胎児中脳由来神経細胞をパーキンソン病モデルラットに移植すると、回転行動の改善が見られた^(1.44)。しかし、初代神経組織由来の神経幹細胞は分裂回数が限られており、実際には長期間の安定した継代培養は難しく、凍結保存する必要がある。

ニューロスフェアに対する凍結保存研究の報告では、あまり詳細な方法は記述されておらず、多くの研究では、10~15v/v%のDMSOを用いて緩速凍結し、液体窒素中で保存後、急速解凍している^(1.20)。*in vitro* で増殖させた胎児ラット由来初代神経幹細胞を凍結保存・融解後、形態は非凍結の場合と同等だったが、ドーパミン神経細胞への分化能は低下していた^(1.44)。同様に増殖させた胎児ラットの初代神経幹細胞を凍結保存・融解後、生存性を調べたところ、60%程度となったという報告もある^(1.45)。ヒト胎児由来神経幹細胞の凍結保存・融解後の生存性は70~95%であり、少なくとも2回の凍結・融解の繰り返しまでは、分化能を保っていた^(1.46)。幹細胞を4回継代後、凍結保存し、融解後さらに9回継代し、ラットに移植したところ、移植後の生着、増殖、分化が観察された^(1.47)。しかし、移植細胞は、神経組織以外の部分にも侵入しており、この原因は不明である。

多数の神経細胞を生み出す神経幹細胞は、成熟した大人のマウスからも得られ、*in vitro* で増殖させ、凍結保存・融解後にパーキンソンモデルラットに移植する実験が行われた^(1.48)。融解後の細胞の生存性は、85~95%であり、移植後の回転行動は改善されたが、移植片のサイズは非凍結の場合の 67%だった。

Milosevic らは、マウス胎児前脳由来神経幹細胞に対して、複数の凍結保護物質（グリセロール、エチレングリコール、DMSO、血清、トレハロース）の効果を比較している^(1.49)。細胞は、緩速凍結保存され、急速融解から 1 週間後、いずれの条件でも細胞の生存性は 50%以下に減少した。もっとも成績が良かったのは、10%グリセロールまたは 10%DMSO を用いた場合で、トレハロースの有無には依存しなかった。生存性は減少したものの、神経細胞の分化能は、非凍結の場合と同等だった。

神経幹細胞を、初代神経組織からだけでなく、胚性幹細胞（ES 細胞）から分化誘導することにより入手する方法も発見され^(1.50)、これにより移植細胞の供給源の選択肢が増えた。わずかな細胞数の ES 細胞からでも、大量の神経細胞を生み出すことが可能である。しかし、神経幹細胞から神経細胞を誘導するのは数日で済むのに対し、ES 細胞から誘導する場合は 3~4 週間かかるため、神経幹細胞に誘導した状態で凍結保存しておくことが望まれる。マウス ES 細胞から誘導した神経幹細胞を 10v/v%DMSO で緩速凍結保存・急速融解後の形態は非凍結の場合と同等であり、分化誘導後に神経細胞マーカーを発現し、電気的興奮性も有していたが、生存性としては 52%だった^(1.51)。なお、ES 細胞由来神経幹細胞は、分化が不十分な状態で移植すると癌化する危険性があり^(1.52)、安全性を確実にするための検討が続けられている。

1.4.2 神経ネットワークの凍結保存

創薬時の薬・毒物スクリーニングでは、現在、新鮮な初代神経細胞懸濁液や凍結保存された神経細胞懸濁液、新鮮な神経組織の切片が用いられているが、細胞懸濁液としての神経細胞の場合には、実験に使用する前に、分化誘導・神経突起伸長・神経ネットワーク形成の過程が必要となり煩雑である。もし、*in vitro* でネットワークを形成した細胞をそのままの状態に凍結保存が出来れば（Fig. 1.3c）、神経細胞を用いたスクリーニングの大幅な効率化が実現できると考えられる。また、同様に、新鮮な神経組織を凍結保存した組織（Fig. 1.3d）に置き換えることが出来れば、非常に便利であり、その場合には *in vivo* での神経ネットワークの維持が要求される。しかし、このような目的の研究はこれまでほとんど追究されておらず、未だ実用化はされていない。

Ma ら^(1.53)は、マウス胎児脊髄由来初代神経細胞を *in vitro* で培養し、ネットワーク形成した神経細胞に対する凍結保存を行った。細胞に神経ネットワークを形成させた後、ディッシュに接着させたまま、10v/v%DMSO を添加した培養液に平衡し、細胞をコラーゲンに包埋する場合と包埋しない場合で比較した。緩速に-80°C まで冷却後、液体窒素中に移し、2 か月間保存した。融解後、コラーゲンに包埋した場合の方が、コントロールよりも、細胞膜の色素排斥能に基づいた生存率が約 2 倍程度高かった。さらに、持続的な情報伝達のために必要なシナプス小胞のリサイクリングも、コラーゲンへの包埋を行った群でのみ観察された。同様の実験系で、Malpique ら^(1.54)は、材料として神経様細胞へ分化誘導したマウス神経芽細胞腫由来細胞株 (N2a 細胞) を用い、細胞をアルギン酸塩ゲルに包埋することによって、包埋しない場合よりも、細胞内酵素活性に基づく生存性が 3 倍程度上昇することを示した。しかし、これらの研究では、ゲルに包埋した場合でもまだ生存率が比較的低く (6~7 割程度)、また、電気的な機能の正常性は調べられていない。

また、Pichugin らは、ラットの海馬組織の切片 (厚さ 475 μ m) に対して、ガラス化保存と緩速凍結保存の比較を行った^(1.55)。ガラス化保存では、61w/v%の凍結保護物質を含むガラス化液と平衡させ、液体窒素で冷却されたアルミニウム製のブロックに接触させることで、-130°C まで冷却し、3~7 分維持した後、急速に加温した。緩速凍結保存では、30w/v%のグリセロールを含んだ溶液で、約 1°C/min で-20°C まで冷却後、即座にウォーターバスで融解した。融解後、切片全体から抽出した K⁺と Na⁺の濃度比を生存性の指標として評価した場合、ガラス化保存の方が、緩速凍結保存に比べ、その生存性が 3~6 倍程度向上し、非凍結の場合の 90%以上まで到達することが示された。ただし、神経伝達能や、より長時間保存後の生存性については調べていない。

以上のように、神経ネットワークの凍結保存研究では、細胞の生存性と神経伝達能の両方を十分に保存出来たことを報告した例はなく、また、凍結・融解挙動や、生存性に対する冷却条件の詳細な影響などの基礎的な点も調べられていない。なお、凍結保存した神経組織の移植への応用についても研究されているが、神経細胞・組織は、基本的に移植前に懸濁する必要があるため、当該研究では神経ネットワークの保存については考慮されていない。

1.5 本研究の着眼点と目的

神経細胞の凍結保存では、再生医療における細胞移植療法や創薬時の薬・毒物スクリーニングにおける細胞準備の効率化などを目的とし、これまで主に、懸濁液の状態の神経突起を持たない細胞を対象に研究されてきた（「1.4.1」項）。しかし、懸濁状態の神経突起を持たない神経細胞は、融解後の準備が煩雑である。ネットワークを形成させた細胞群を、そのままの状態に凍結保存が出来れば、神経細胞や神経組織を用いたスクリーニングの大幅な効率化が実現できると考えられが、このような研究は、まだ少なく、未解明な点が多い。例えば、凍結・融解後の神経ネットワークの神経伝達能の正常性に関する検討はこれまでほとんどなされていない。また、細胞レベルでの詳細な凍結・融解挙動や、生存性に対する冷却条件の影響などの基礎的な点も調べられていない。

そこで、本研究では、神経ネットワーク形成に必要な神経突起を有する神経細胞の凍結に関する基礎的特性を理解することを目的とする。当該細胞は、薬理効果を調べる創薬分野で実験材料として応用上必要不可欠であるだけでなく、また、細胞体から多数の細長い神経突起が伸びるという特徴的な形態を持つため、形態学的な基礎的観点からも興味深い。

実験材料としては、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞株を用いる。PC12 細胞は、神経成長因子（NGF）の作用により、細胞体まわりに神経突起を伸展させ、交感神経細胞様に分化し、神経細胞のモデル細胞として汎用される。本細胞の使用にあたっては、実験材料を安定的・効率的に準備するために、まずその増殖・分化特性を実験的に把握する。また、その結果に基づき、細胞の増殖・分化の反応速度論的定式化による数学的モデル化を展開すると共に、速度定数であるモデル定数のパラメータスタディにより、モデル特性を解明する。さらに、本モデルを PC12 細胞の実験結果に対して適用し、実験値とモデルによる計算値との比較からモデルの妥当性を検討する。このようなモデル化は、例えば、関連プロセスの設計・最適化などの点から有益である。

上記の検討によって明らかになった最適な培養条件（血清濃度）を元に準備した分化型 PC12 細胞に対して、まずは細胞回りの水溶液環境を生理食塩水とし、冷却条件を変化させ、凍結実験を行う。以下に、各検討項目について説明する。

- 1) 冷却過程では、凍結様式、氷結晶の形態、氷結晶と細胞の相互作用などの凍結挙動を明らかにする。細胞外凍結と細胞内凍結では細胞の損傷機構が大きく異なるため、凍結様式の解明は特に重要である。
- 2) 凍結・融解後、細胞の形態変化を観察する。主に神経突起に特徴的な形態変

化（数珠状化と短小化）が生じるため、これを定量的に検討する。神経突起は、神経細胞間の情報伝達を担うため、その形態変化は当該機能へ影響を及ぼす可能性がある。

- 3) 凍結・融解後の細胞の形態変化をより詳細に理解するため、細胞骨格の一種である中間径フィラメントの分布の変化も調べる。そのため、中間径フィラメントの構成タンパク質である **Neurofilament L** に対する免疫細胞化学染色を行い、蛍光観察する。中間径フィラメントは、一般的に細胞に機械的強度を与える役割を担う。
- 4) 凍結・融解後に形態変化が生じる原因の一つとして、細胞外凍結における未凍結水溶液の濃縮による浸透圧ストレスが考えられる。そこで、凍結・融解後の形態変化に関して、当該過程における細胞に対する環境因子として、**NaCl** 濃度に起因する浸透圧ストレスに注目し、その影響を調べる。細胞回りの水溶液中の **NaCl** 濃度を変化させることにより、等張→高張→等張と変化させ、形態変化を観察する。
- 5) さらに、凍結・融解後の細胞の生存性を計測する。生存性は、凍結保存技術の重要な評価指標であり、一般に、注目した特定の機能の凍結前後の保持割合として定義される。本研究では、細胞膜の色素排除能に注目し、色素排除試験で汎用される **Propidium Iodide (PI)** を用い、細胞の生死判別を行う。

凍結保存の目的のためには、凍結保護物質の添加が必須である。そこで、以上の検討で明らかにした凍結・融解特性に対する凍結保護物質の効果を明らかにする。代表的な細胞膜透過型凍結保護物質であり、懸濁した初代神経細胞の凍結保存研究において最も広く用いられている **DMSO** を添加した生理食塩水中で、神経様細胞に対して、上記と同様の検討を行う。なお、本実験条件で、凍結・融解後の未分化型 **PC12** 細胞の生存率も調べ、分化段階の異なる細胞の凍結耐性の違いについて検討する。

1.6 本論文の構成

本論文は 5 章から構成される。以下に各章の概要を紹介する。

第 1 章

細胞の凍結に関する一般的・基礎的知見をまとめると共に、本研究で扱う神経細胞の凍結に関連する従来の研究、および、本研究の着眼点と目的について述べた。

第 2 章

実験材料である PC12 細胞の増殖・分化特性を検討すると共に、その結果に基づき、細胞増殖・分化の反応速度論的モデルを展開し、モデル定数のパラメータスタディにより、モデル特性を解明する。さらに逆問題解析から増殖・分化の速度定数を決定し、実験値とモデルによる計算値との比較からモデルの妥当性を検討する。

第 3 章

第 2 章の結果に基づいて準備した分化型 PC12 細胞に対して、まずは生理食塩水中で、冷却条件を変化させ、1) 凍結様式、氷結晶の形態、氷結晶と細胞の相互作用などの凍結挙動を明らかにする。次いで、凍結・融解後に、2) 細胞の形態変化を調べ、その主要な変化である神経突起の数珠状化と短小化を定量的に評価し、3) 免疫細胞化学染色を用いることにより、細胞骨格（中間径フィラメント）の変化特性も調べると共に、4) 形態変化に及ぼす浸透圧ストレスの影響を調べる。さらに、5) 細胞膜の色素排斥能の評価に基づいて、細胞の生存性を計測する。以上の結果を踏まえ、これらの特性の関連性についても検討する。

第 4 章

分化型 PC12 細胞の凍結・融解特性に対する凍結保護物質の効果を明らかにするため、DMSO を添加した生理食塩水中の細胞に対して、3 章と同様の検討を行い、その結果を比較する。さらに、本実験条件で凍結・融解後の未分化型 PC12 細胞の生存率との比較なども行う。

第 5 章

本研究の結論をまとめ、今後の課題および展望について述べる。

第 2 章

未分化神経様細胞の増殖・分化特性と その反応速度論的モデル

2.1 緒言

本研究では、神経突起を有する神経様細胞である、基質に付着した分化型 PC12 細胞に対する凍結実験を行う。しかし、従来の方法を用いて PC12 細胞の分化誘導を行うと、未分化型 PC12 細胞の増殖が強く、分化型 PC12 細胞をあまり効率良く準備出来なかった。そこで、PC12 細胞の増殖・分化特性を詳細に把握する必要性が生じた。

一方、このような細胞の増殖（数の増加）・分化（形態的、機能的な特殊化）や、外部ストレスに対する細胞の応答、損傷・死滅、細胞の損傷修復などの生物学的プロセスを、数学的に記述することは、1)当該プロセスの特性の解明、2)その特性を特徴づける特性値の定義と変化の特性の解明、3)関連プロセスや手法の定量的評価、4)関連プロセスの設計・最適化などの点から有益である。数学的モデル化は、原理的には、システム生物学^(2.1-2.3)分野の研究成果に基づく取り扱いが厳密で理想的であるが、現状では、ある程度、実験結果に基づく現象論的取り扱いが有望で可能な方法である。

高温ストレスによる細胞や組織の損傷や死の数学的モデル化に関しては、熱傷や温熱療法の効果を定量的に評価するなどの研究が広くなされている^(2.4-2.6)。組織の損傷の度合いを表現する損傷関数が導入され^(2.7)、1次・2次反応^(2.4-2.6)や酵素の不活性化^(2.8)に基づいて速度定数が決定されている。これらの研究では、様々な生体材料、細胞、組織における速度定数であるモデル定数の詳細な情報（アレニウス方程式の頻度因子と活性化エネルギー）を明らかにしている。また、細胞の生存性を数学的に記述するため、多段階の反応に基づいた細胞損傷と細胞死の定式化・モデル化^{(2.9)(2.10)}や、統計的なモデルに基づいた関数の適用^{(2.10)(2.11)}なども行われている。

また、石黒らは、生体熱工学の医療応用（熱凝固療法、温熱療法、凍結保存、凍結手術、凍結形成術など）に関わる、種々のストレス（高温、低温、凍結、化学物質、乾燥など）による細胞損傷・死滅の数学モデルの構築を目指す体系的な研究の一環として、これまで主に温熱ストレスについて、細胞損傷・死滅の反応速度論的定式化による数学モデルを発展させてきた。すなわち、定常ストレスが課された場合^(2.12-2.14)、非定常ストレスが課された場合^{(2.15)(2.16)}、二つの異なる死滅モードが共存する場合^(2.17)、ストレス感受性の異なる二種類の細胞が共存する場合^(2.18)などに対して、数学モデルを発展させてきた。

細胞の増殖・分化についても、現象を確率論的に捉えるモデル^(2.19-2.21)や、反応速度論的に捉えるモデル^(2.22-2.27)が、種々の細胞に対して研究されている。しかし、神経分化に関しては、未分化細胞や分化細胞の細胞数を定量的に計測し

た例^(2.28-2.30)はいくつかあるが、その数学的モデル化は未だ検討されていない。

この背景において、本章では、神経様細胞への分化能を持つ **PC12** 細胞の増殖・分化特性を実験的に解明すると共に、その結果に基づき、細胞増殖・分化の反応速度論的モデルを展開する。まず、1)血清濃度を変化させ、**PC12** 細胞の増殖・分化による細胞数の時間変化の基本的特性を実験的に把握する。次いで、2)その実験結果の現象論的検討に基づいて、細胞数の時間変化を記述する反応速度論的モデルを展開すると共に、3)細胞増殖と分化の速度定数であるモデル定数のパラメータスタディにより、モデル特性を解明する。さらに、4)本モデルを **PC12** 細胞の実験結果に対して適用し、細胞数の時間変化の実験値に基づいた逆問題解析から増殖・分化の速度定数を決定し、実験値とモデルによる計算値との比較からモデルの妥当性を検討する。

2.2 実験材料および方法

2.2.1 実験材料

神経成長因子 (Nerve growth factor (NGF)) により神経突起を伸展させ、交感神経細胞様の成熟神経細胞に分化するモデル細胞として、入手や操作が比較的簡単で汎用される PC12 細胞 (ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞株, 理研細胞バンク) を用いた^{(2.31)(2.32)}. 未分化型 PC12 細胞は、自己増殖しつつ、分化型 PC12 細胞へと分化するのに対して、後者は自己増殖しない性質をもつ. 細胞の増殖と分化は、一般的に細胞まわりの水溶液環境 (培地) 中の化学成分濃度に依存し制御される. 血清の添加により細胞増殖が進み、NGF の添加により細胞分化が誘導される^{(2.31)(2.33)}.

Fig. 2.1 に示すように、PC12 細胞は、未分化状態では、神経突起を持たず比較的丸みを帯びた形 (付着状態で) であるのに対し、分化型 PC12 細胞は、細胞の中心部である細胞体から神経突起が伸びる構造をもつ. 細胞体内部には一般的な細胞小器官 (核、ミトコンドリアなど) や細胞骨格があり、神経突起内には主に細胞骨格がある. 本研究で用いた未分化・分化細胞の形態的特徴の概略 (約 15~30 個の細胞に対する平均値±標準偏差) を Table 2.1 に示す. 細胞体のサイズは、その面積と等しい円の直径 (等価円直径) とし算出された.

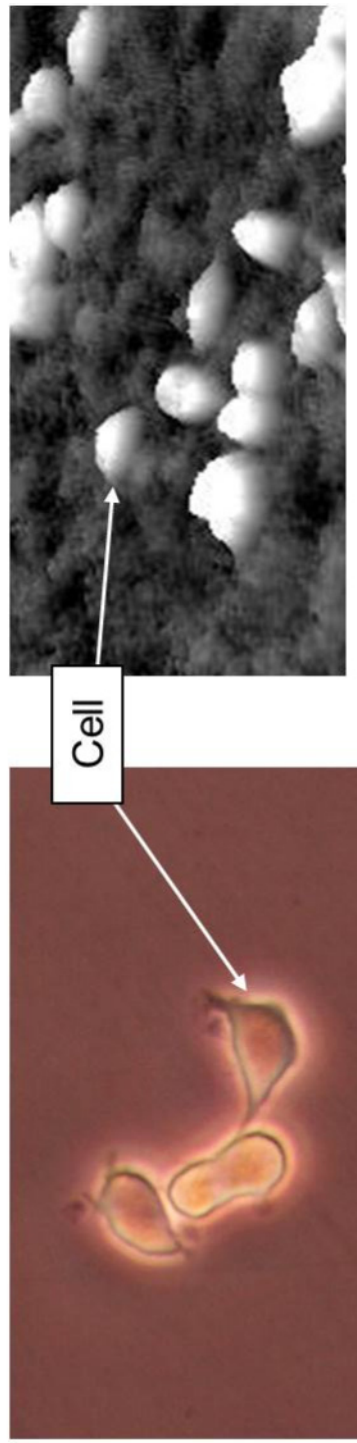
2.2.2 PC12 細胞の継代培養と分化誘導

本研究では、未分化細胞の増殖下における分化を主な対象とするが、分化誘導を行わない (NGF を添加しない) 場合の未分化細胞の増殖特性、および、分化誘導を行う (NGF を添加した) 場合の未分化細胞の増殖・分化特性に対して、血清濃度の影響を実験的に調べた. 血清は、通常、細胞の生存に必要な液性因子 (例えば、栄養因子、増殖促進因子) や培地の pH 緩衝作用を有し、未分化細胞の増殖と分化に対して影響を持つ. NGF は未分化細胞の分化を誘導する効果や分化過程を安定化させる効果を持つ^{(2.31)(2.33)}.

未分化細胞の分化誘導を行うか否かによらず、まず、未分化型 PC12 細胞の継代培養の標準的な条件として、1) ディッシュ (60mm Falcon dish, コロナ処理済, BD 社製) 面上のコンフルエントに近い状態の未分化型 PC12 細胞を、ピッペティングにより剥がし、培地に懸濁後、新しいディッシュに播種し、37°C, 10%CO₂ 環境で培養する. なお、細胞培養に必要な主な装置について付録 A に示す.

継代培養の周期は約 1 週間とし、その間、培地交換は行わない. 継代数 2 から 20 回の細胞を実験に用いた. 培地は、濃度 10v/v% の血清 (5.0v/v% 牛胎児血清 (FBS) (EQUITEC-BIO. Inc.製) と 5.0v/v% 馬血清 (HS) (GIBCO 社製))

a) Undifferentiated



b) Differentiated

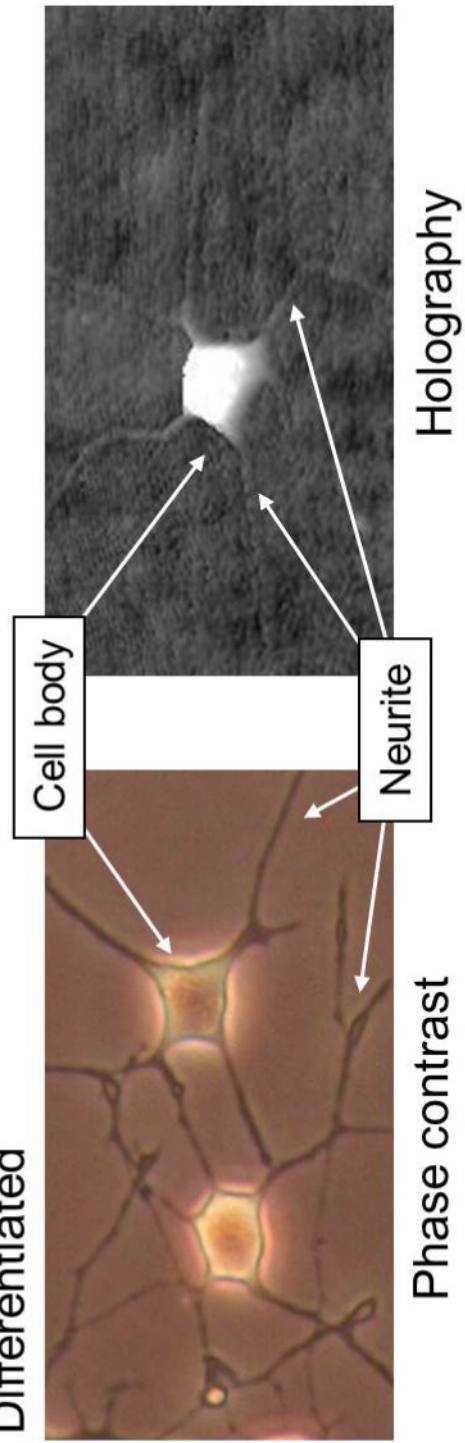


Fig. 2.1 Morphology of PC12 cells

Table 2.1 Morphological characteristics of PC12 cells

Undifferentiated	Differentiated	
Cell size* : $15.8 \pm 3.1\mu\text{m}$ (24cells) Thickness: $4.6 \pm 1.2\mu\text{m}$ (20cells) Volume: $1230.9 \pm 520.5\mu\text{m}^3$ (20cells)	Cell body	Size* : $25.4 \pm 5.4\mu\text{m}$ (25cells) Thickness: $5.2 \pm 0.8\mu\text{m}$ (4cells) Volume: $2249.8 \pm 448.6\mu\text{m}^3$ (4cells)
	Neurite	4.8 ± 1.2 neurites/cell (16cells) Length : $103.7 \pm 31.8\mu\text{m}$ (10cells) Width: $2.4 \pm 0.5\mu\text{m}$ (10cells)

* : Equivalent diameter

を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (GIBCO 社製) である。なお、血清は等量の FBS と HS からなり、両者の濃度の合計を血清濃度 (v/v%) とした。

未分化細胞のみの増殖特性を調べる (未分化細胞の分化誘導を行わない) 場合には、上記 1) に続いて、

2) 手順 1) の継代培養の過程で、細胞数密度を約 1500 cells/cm² で細胞を播種し直し 24 時間後、所定の濃度の血清を含む培地と入れ換える。培地中の血清濃度を 5 通り (0.0, 0.1, 0.5, 2.0, 10.0 v/v%) に変化させる。細胞の剥離は、培地を吸引後、0.05% Trypsin-EDTA (GIBCO 社製) を 300 μ l を加え、インキュベータ (37°C, 3 分間) 内に置いた後、培地を加え、ピペッティングによる。また、Trypsin-EDTA の除去は、遠心により細胞を沈殿 (付録 A) させた後、上部の水溶液の吸引による。

3) 手順 2) の培地を用い、毎日、培地を全量交換し、9~11 日間、培養 (37°C, 10%CO₂ 環境) を行う。

未分化型 PC12 細胞の神経分化誘導を行う場合には、上記 1) に続いて、

2) 手順 1) の継代培養の過程で、底面にコラーゲン (Calf skin Collagen I, Elastin Products 社製) コーティングを施したディッシュに、細胞数密度を約 1500 cells/cm² で細胞を播種し直し 24 時間後、100ng/ml NGF (NGF-7S from murine submaxillary gland, Sigma 社製) と所定の濃度の血清を添加した DMEM を培地とし入れ換える。培地中の血清濃度を 7 通り (0.0, 0.004, 0.02, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 v/v%) に変化させた。細胞の剥離と Trypsin-EDTA の除去は、未分化細胞のみの増殖特性を調べる場合の上記の手順 2) と同様である。

3) 手順 2) の培地を用い、毎日、培地を全量交換し、9~11 日間、培養 (37°C, 10%CO₂ 環境) を行う。

2.2.3 細胞の撮影および細胞数の計測法

前節の細胞の培養過程において、倒立顕微鏡 (DMIRB, LEICA 社製) (Fig. 2.2) とデジタルカメラシステム (DP50, OLYMPUS 社製) (Fig. 2.2) を用い、細胞の形態を時系列で明視野と位相差で観察・記録した。また、未分化細胞と分化細胞の代表的な形態を、デジタルホログラフィー顕微鏡 (HoloMonitor M3, Phase Holographic Imaging 社製) (付録 B) により 3 次元的に計測した。

位相差画像を基に、未分化細胞と分化細胞の判別を行い各細胞数を計測した。未分化・分化細胞の判別法は、細胞の形態に基づいて、細胞体の等価円直径に比べ、長い神経突起を持つ細胞を分化細胞とし、短い神経突起を持つ細胞、ま

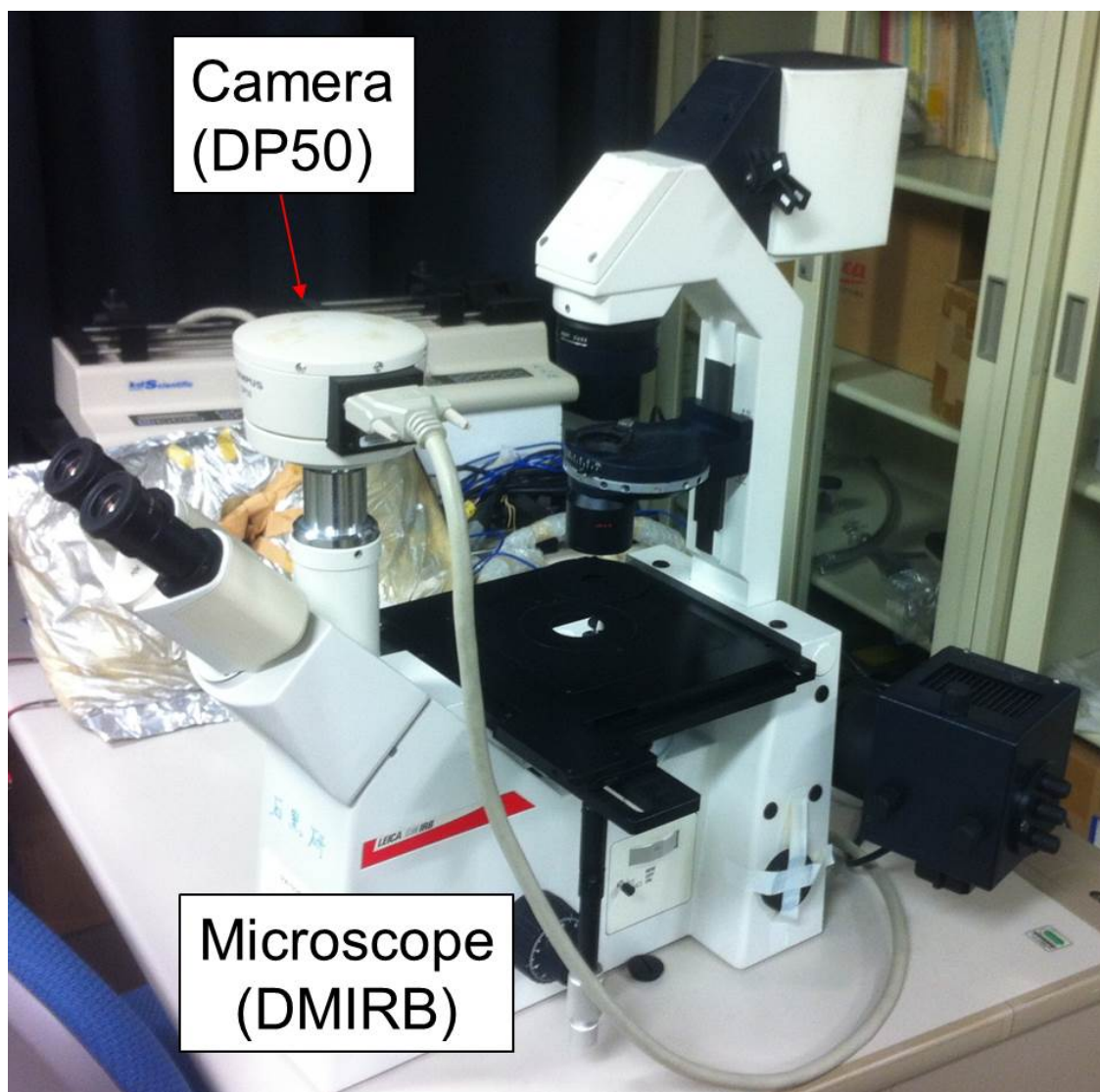


Fig. 2.2 Outlook of inverted microscope (DMIRB) with CCD camera (DP50)

たは，神経突起の無い細胞を未分化細胞とした^{(2.28)(2.30)}．細胞数の計測は，顕微鏡下のシャーレ中の約 10 スポット（スポット面積 = $0.473\text{ mm} \times 0.634\text{ mm} = 0.300\text{ mm}^2$ ）で行い，その平均値と標準誤差を算出した．なお，本研究では，培養のシャーレ底面に付着している細胞を，生細胞と見なし，未分化・分化細胞の判別や計数の対象とした．自然に剥がれ培地に浮かぶ細胞は，死細胞と見なし計数から除外された．

2.3 PC12 細胞の増殖・分化特性

2.3.1 実験結果

2.3.1.1 神経分化を伴わない場合（NGF 無添加の場合）の未分化細胞数の時間変化

NGF 無添加の場合、未分化細胞の分化は起こらず、全ての細胞が未分化細胞で、それらは、自己増殖、または、死滅するだけである。血清濃度に対する η_1 （平均値±標準誤差）の時間変化の実験結果を Fig. 2.3 に示す。図中の曲線は 2.5 で述べる最適曲線である。

Fig. 2.3a で $C = 0.0, 0.1$ v/v% の場合、剥離細胞の増加により未分化細胞数は初期細胞数から単調減少した。 $C = 0.5$ v/v% の場合には、未分化細胞数は、細胞播種後、2~3 日間は増加するものの、その後、減少傾向となった。また、血清濃度が低い程、細胞数は少なかった。一方、Fig. 2.3b の $C = 2.0, 10.0$ v/v% の場合には、細胞播種後、培養時間の経過と共に、細胞数は指数関数的に増加し、血清濃度が高い方が細胞数は多かった。Fig. 2.4 に、 $C = 10.0$ v/v% の場合の細胞の培養過程の典型的な画像を示すが、時間経過に対して、細胞の剥離が殆どなく、安定に増加した。

2.3.1.2 神経分化を伴う場合（NGF 添加の場合）の各細胞数の時間変化

NGF 添加により細胞分化が起こり、未分化細胞と分化細胞が共存する。血清濃度に対する $\eta_1, \eta_2, \eta_t, \gamma$ の時間変化の実験結果を Figs. 2.5 と 2.6 に示す。 η_1, η_2, η_t に関しては平均値±標準誤差を示し、 γ は η_2 と η_t の平均値から算出された。なお、Fig. 2.5 中の曲線は実験点を結ぶ滑らかな曲線で、Fig. 2.6 中の曲線は 2.5 で述べる最適曲線である。

$C = 0.02$ v/v% の場合（Fig. 2.5b），細胞播種後、約 3~4 日の間、未分化細胞の増殖と分化により、 η_1 がほぼ一定の状態で、 η_2 と η_t がある程度、増加したが、その後、未分化・分化を問わず剥離細胞が増え、 η_1, η_2, η_t は減少傾向で、 γ は増加傾向を示した。この細胞数の減少傾向は、 $C = 0.004$ v/v% の場合（Fig. 2.5a）のように血清濃度が低い方が早い段階で始まった。

これに対して、Fig. 2.6（ $C = 0.1 \sim 4.0$ v/v%）では、細胞の死滅は殆どなく、未分化細胞の増殖と分化は安定的に進行した。Fig. 2.7 に、 $C = 0.1$ v/v% の場合の細胞の培養過程の典型的な画像を示す。各細胞数の時間変化の特性は血清濃度に依存するが、 $C = 0.5 \sim 4.0$ v/v% では定性的に概ね同様の特性を示した。すなわち、 η_1, η_2, η_t は、基本的に、時間経過に対してほぼ単調増加したが、 η_2 は、経過時間が長くなると（6~8 日目以降では）、増加が鈍化し飽和傾向を示した。従って、

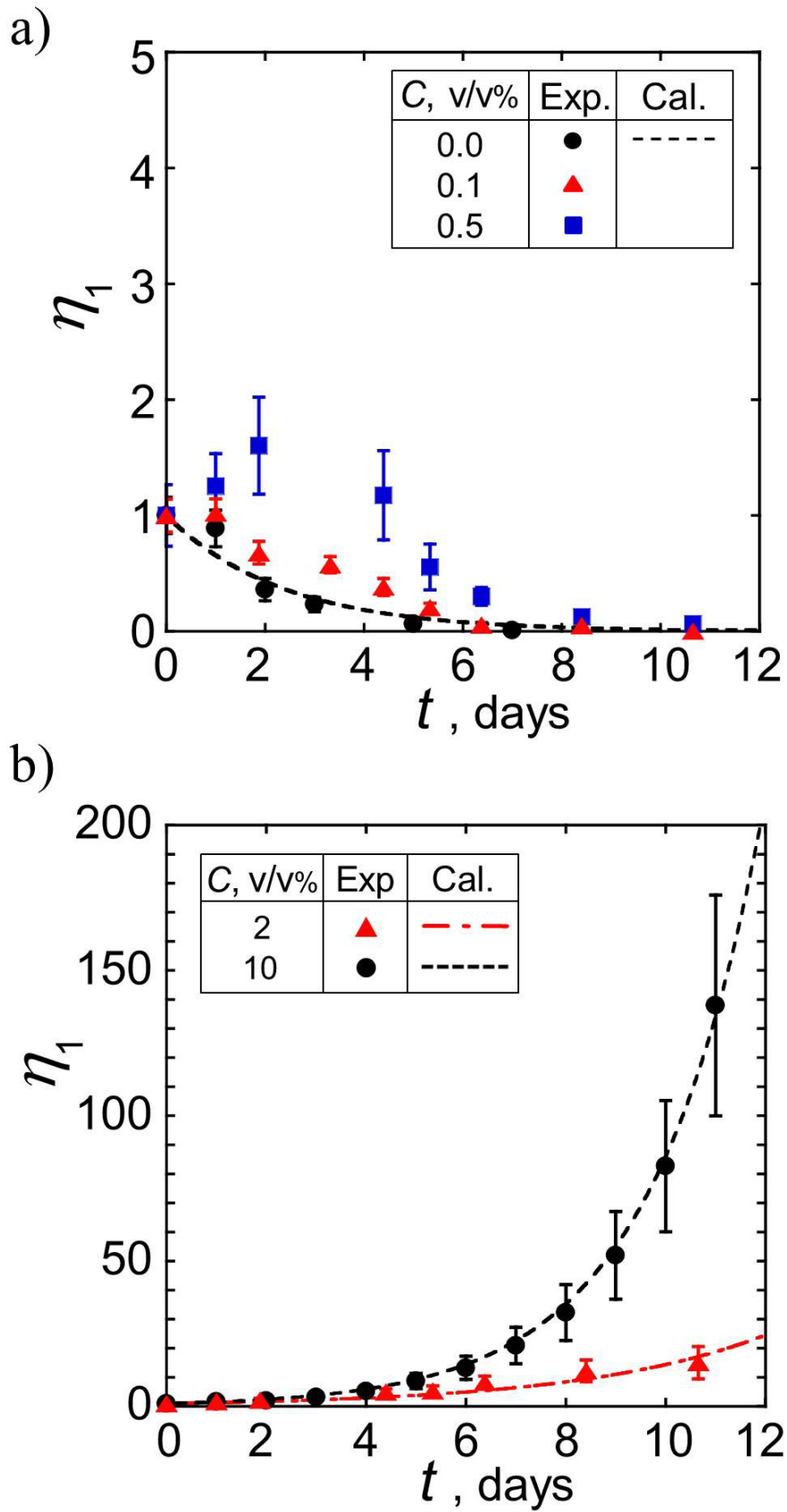


Fig. 2.3 η_1 as a function of time without NGF
for a) insufficient serum-concentration and b) higher serum-concentration.

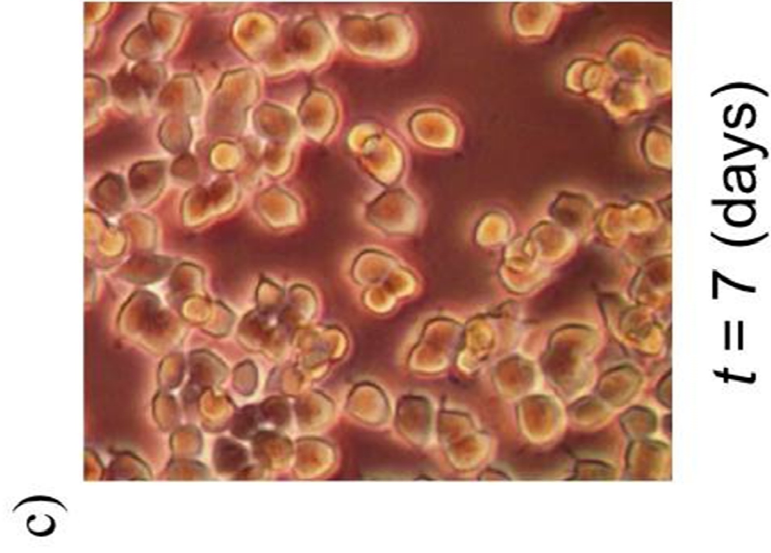
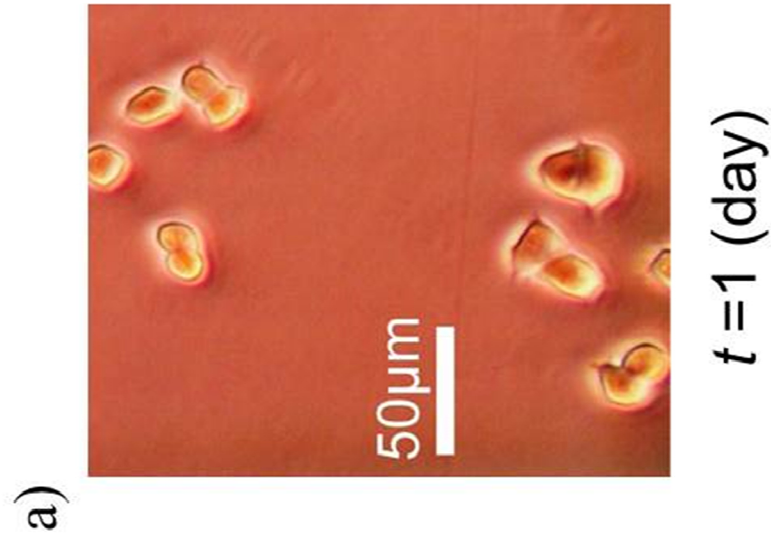


Fig. 2.4 Morphology of undifferentiated PC12 cells during cell culture without NGF

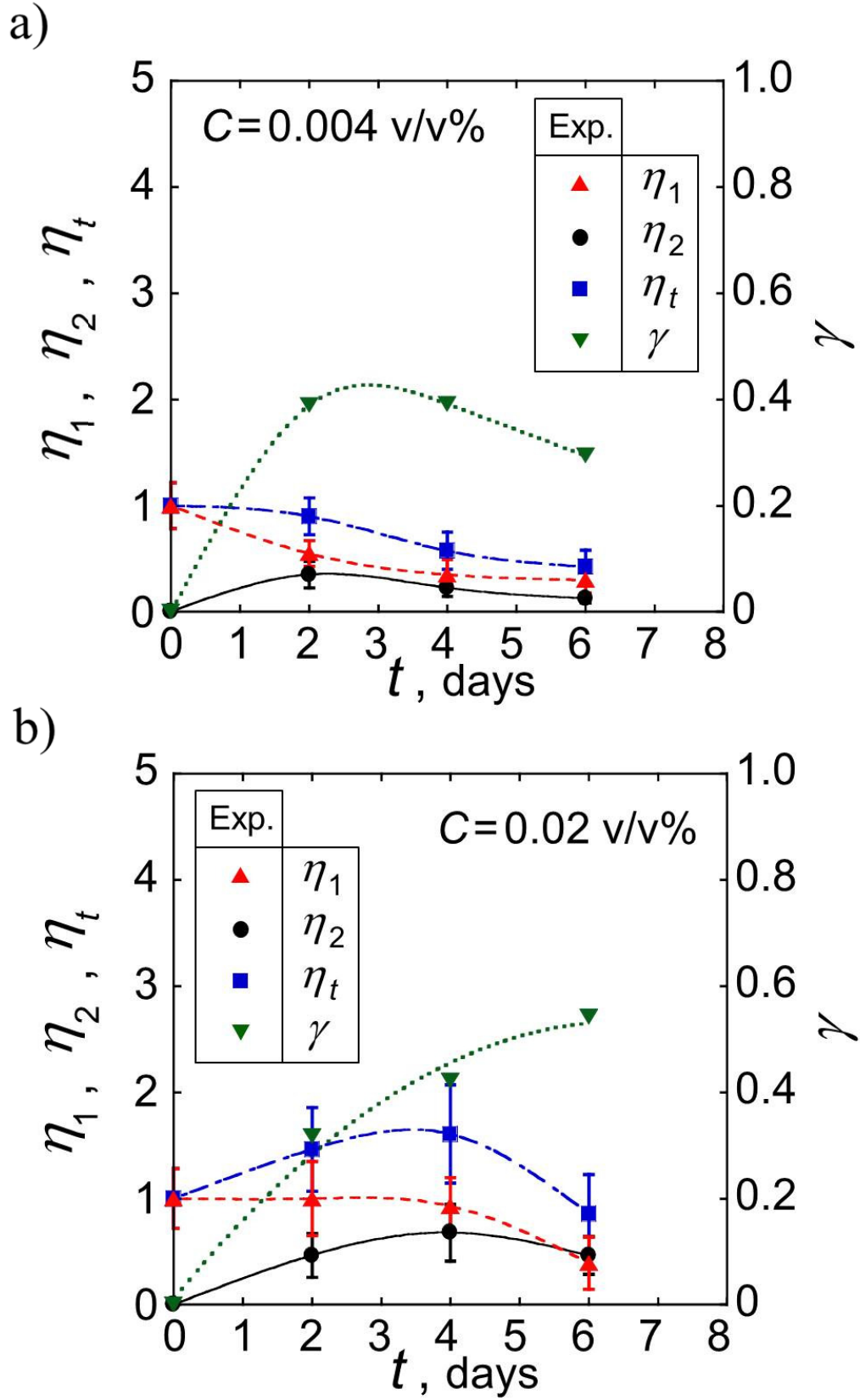


Fig. 2.5 η_1 , η_2 , η_t , and γ as a function of time from beginning of cell differentiation for insufficient serum-concentration with NGF

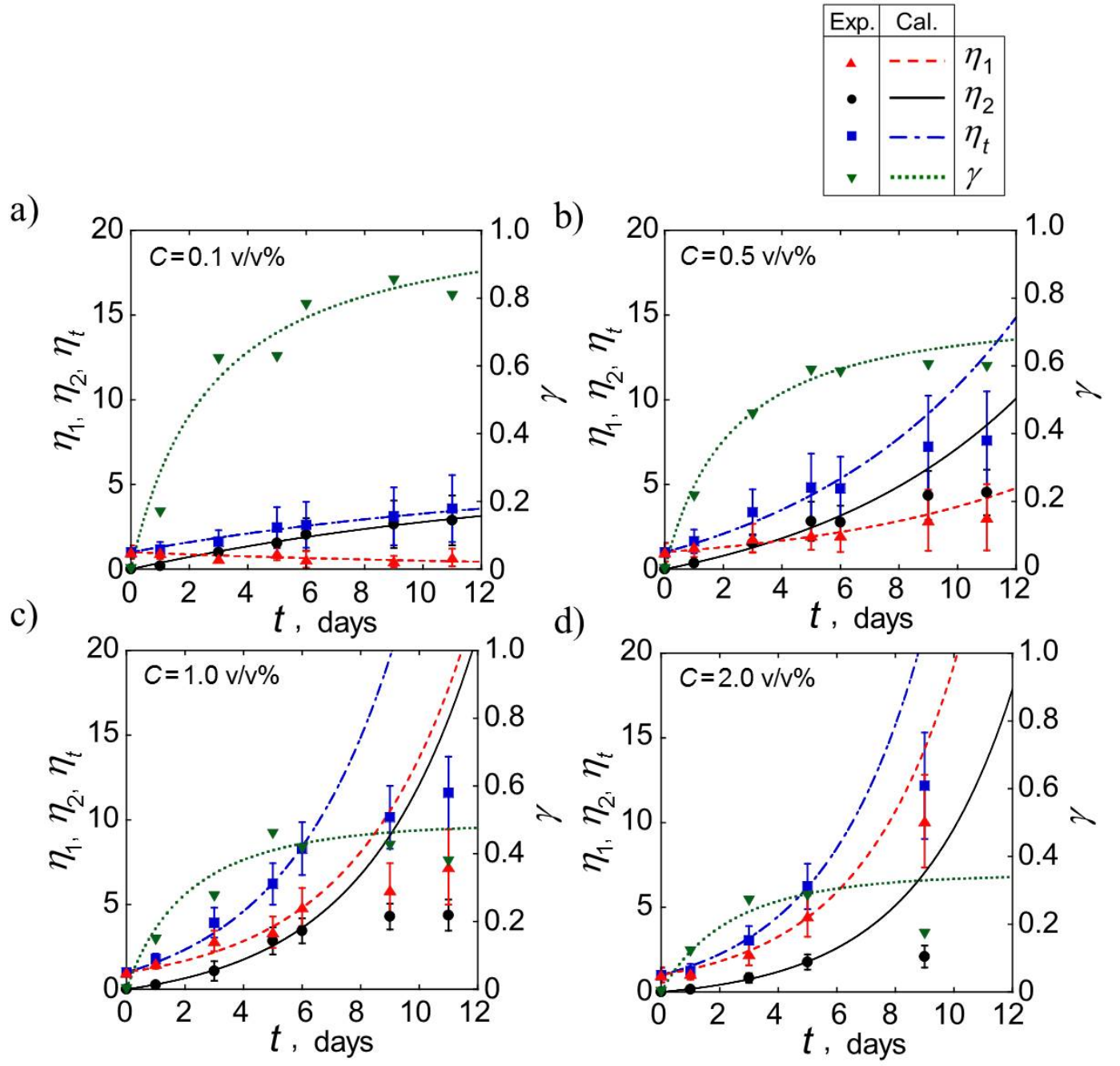


Fig. 2.6 η_1 , η_2 , η_t , and γ as a function of time from beginning of cell differentiation for higher serum-concentration with NGF

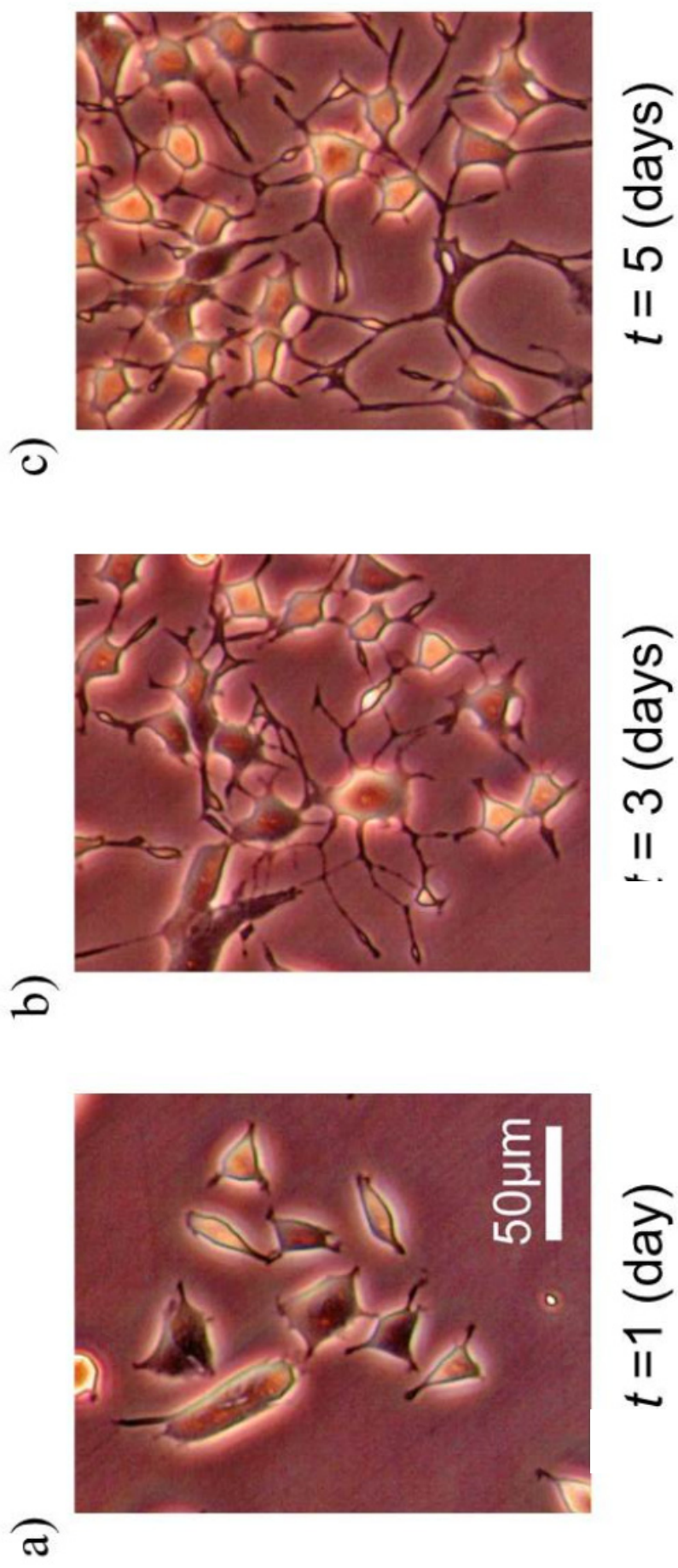


Fig. 2.7 Morphology of differentiated PC12 cells during cell culture with NGF

これに対応して、 γ は、時間経過に対して増加の後、 $C = 0.5$ v/v%では大体 5 日目以降、飽和傾向を示し、 $C = 1.0, 2.0, 4.0$ v/v%では極大値を経て減少傾向を示した。また、 $C = 0.5$ v/v%の場合、3 日目過ぎに明確に、 η_1 と η_2 の逆転があった。

一方、 $C = 0.1$ v/v%の場合、 η_2 と η_t は共に時間に対して単調増加したのに対して、 η_1 は単調減少の傾向を示し、2 日目過ぎに明確に、 η_1 と η_2 は逆転した。従って、 γ は、単調増加後、飽和傾向を示し、Fig. 2.6 中では最も大きい値を示した。

η_1 , η_2 , η_t , γ の各分布の血清濃度に対する依存性としては、 η_1 は、 C に対して概ね単調増加し、 $C = 2.0, 4.0$ v/v%で飽和傾向を示すのに対して、 η_2 は、値の変化が小さく、 $C = 0.1$ v/v%から増加し $C = 0.5 \sim 1.0$ v/v%で極大をとった後、減少し、 $C = 2.0, 4.0$ v/v%ではほとんど変化しなかった。従って、 η_t は単調増加し $C = 1.0 \sim 4.0$ v/v%で飽和傾向を示した。 γ は C に対して概ね単調減少した。

2.3.2 考察

2.3.2.1 神経分化を伴わない場合の未分化細胞の増殖特性

血清には、種々の液性因子（栄養因子、増殖促進因子、細胞障害保護因子など）が含まれ、未分化細胞の生存、増殖、分化に対して影響を持つ^(2,34)。NGF 無添加で、 $C = 0.0 \sim 0.5$ v/v%の場合、剥離細胞の増加による未分化細胞数の減少がみられ、血清濃度が低い程、細胞数は少なかったが、これは当該範囲の血清濃度が、細胞の生命維持と増殖のために十分な量ではなく、細胞死が起こりやすいためと考えられる。一方、 $C = 2.0, 10.0$ v/v%の場合には、細胞の剥離が殆どなく、安定に増加した。血清中の液性因子の増加により、細胞の生存と増殖が促進されたためと考えられる。

2.3.2.2 神経分化を伴う場合の未分化細胞の増殖と分化の特性

NGF 添加の場合、 $C \leq 0.02$ v/v%において、未分化・分化を問わず剥離細胞が増え、 η_1 , η_2 , η_t は減少傾向を示し、細胞数の減少傾向は、血清濃度が低い方が早い段階で始まった。NGF 無添加の場合に比べ、細胞死が生じ始める血清濃度が低いのは、NGF の機能として細胞の生存をサポートする効果もあり^(2,33)、細胞死が抑制されたためと考えられる。

これに対して、 $C = 0.1 \sim 4.0$ v/v%では、未分化細胞の増殖と分化は安定的に進行したが、 η_2 が時間に対して飽和傾向を示しやすい。これは、分化型 PC12 細胞は、細胞体の大きさに比べ長い神経突起を有するため、未分化型 PC12 細胞に比べ、細胞当たりの占有面積が広く、接触障害（細胞接触による増殖障害）など

による局所的な細胞数増加の飽和が起りやすいことが原因であると考えられる。

$C = 0.5 \sim 4.0$ v/v% では定性的に概ね同様の特性を示し、 η_1 , η_2 , η_t は、時間経過に対してほぼ単調増加した。これは、基本的に、未分化細胞の増殖が分化に比べ盛んに進行したためと考えられる。一方、 $C = 0.1$ v/v% の場合の η_1 の減少は、未分化細胞の増殖が分化に追従できず、分化による未分化細胞数の減少の影響が、増殖による未分化細胞数の増加の影響より大きいためであると考えられる。以上より、基本的に、血清濃度の増加は、未分化細胞の分化に対する増殖の割合を上昇させる効果を持ち、血清濃度が低くなるほど分化率は高くなると考えられる。

PC12 細胞を樹立した Greene ら^(2,31) は、 $C = 10.0$ v/v% の条件においても、NGF 添加後 6 日程度で未分化細胞の増殖はほとんど無くなり、ほぼ全ての細胞が分化細胞となることを報告している。本研究の PC12 細胞は、長年の継代により、樹立した当時とは性質が異なっている可能性がある。また、Das ら^(2,28) は、PC12 細胞に対して、 $C = 0$ v/v% で、NGF 添加後 7 日目においても死細胞がほとんど生じず、高い分化率が得られることを報告した。本研究の結果と異なる原因としては、分化誘導時の培養液中に、血清蛋白質であるアルブミンなどを添加していることが考えられる。

2.4 細胞増殖と分化の数学モデル

2.4.1 反応速度論的モデル化

2.4.1.1 モデル化と仮定

細胞の増殖・分化に関する詳細なメカニズムには立ち入らず、細胞数レベルでの実験結果の現象論的検討に基づいたモデル化を、以下の仮定の下に行う。

- 1) 細胞の増殖や分化の過程は、各々、一種の反応速度論的变化として記述できる。
- 2) 細胞の分化と状態に関して、未分化細胞と分化細胞、各細胞の生死がある。
- 3) 未分化細胞は、自己増殖すると共に、その一部は、分化細胞へと分化する。分化細胞は、自己増殖せず、別の細胞へも変化しない。また、未分化細胞と分化細胞の各々一部は、時間経過と共に死滅する。
- 4) 各細胞数の時間に対する変化速度は、一次反応系で表される。
- 5) 未分化細胞の増殖と分化に関して、各細胞の相互作用の影響がない（各細胞数の増加に対して、コンフルエント状態を含め、細胞の接触阻害などの影響がない）。

2.4.1.2 定式化

「2.4.1.1」の仮定の下に、細胞の増殖、分化、死滅を定式化するために、Fig. 2.8の反応形態のモデルを提案する。すなわち、未分化細胞の増殖は、自身の細胞数 N_1 と増殖の速度定数 k_1 に基づいて、未分化細胞の分化は、未分化細胞数 N_1 と分化の速度定数 k_2 に基づいて進行する。また、未分化細胞の死滅は、その細胞数 N_1 と死滅の速度定数 k_3 に基づいて、分化細胞の死滅は、その細胞数 N_2 と死滅の速度定数 k_4 に基づいて進行する。

2.4.1.3 基礎方程式と初期条件

Fig. 2.8 の反応形態を数学的に記述するための基礎方程式と初期条件を Table 2.2 に示す。基礎方程式は、分化誘導開始後の経過時間 t に対する各細胞数 $N_i(t)$ の保存式を表し、「2.4.1.1」の仮定 4) から各細胞数の時間に対する微分係数は、当該細胞の生成、死滅などに関連する細胞数と速度定数の積の線形結合により表され、正符号の項は、当該細胞の生成を、負符号の項は、死滅や消滅を表す。従って、基礎方程式は、一階線形連立常微分方程式（式(1)～(4)）を成す。初期状態では、全ての細胞は未分化細胞（式(5)）で、それ以外の細胞は存在しない（式(6)～(8)）とする。一般的に、速度定数 k_i は環境因子（培地中の成分濃度、温度など）に依存し、各細胞数 N_i は t に依存する。

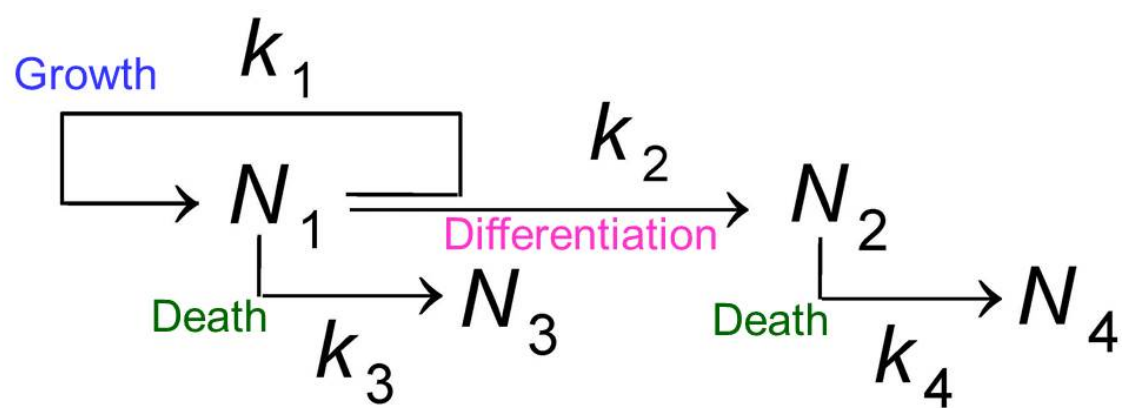


Fig. 2.8 Reaction formulation for modeling

Table 2.2 Basic equations and initial conditions

Basic equations	Initial conditions
$\frac{dN_1}{dt} = (k_1 - k_2 - k_3) \cdot N_1 \quad (1)$	$N_1(0) = N_{10} \quad (5)$
$\frac{dN_2}{dt} = k_2 \cdot N_1 - k_4 \cdot N_2 \quad (2)$	$N_2(0) = 0 \quad (6)$
$\frac{dN_3}{dt} = k_3 \cdot N_1 \quad (3)$	$N_3(0) = 0 \quad (7)$
$\frac{dN_4}{dt} = k_4 \cdot N_2 \quad (4)$	$N_4(0) = 0 \quad (8)$

Table 2.3 Analytical solutions

$k_i \neq \text{const.}$ $(i = 1, 2, 3, 4)$	$\eta_1 \equiv N_1/N_{10} = \exp\left\{\int_0^t (k_1 - k_2 - k_3) \cdot dt\right\} \quad (9)$
	$\eta_2 \equiv N_2/N_{10} = \left[\int_0^t k_2 \cdot \exp\left\{\int_0^t (k_1 - k_2 - k_3 + k_4) \cdot dt\right\} \cdot dt\right] \cdot \exp\left\{-\int_0^t k_4 \cdot dt\right\} \quad (10)$
	$\eta_3 \equiv N_3/N_{10} = \int_0^t k_3 \cdot \exp\left\{\int_0^t (k_1 - k_2 - k_3) \cdot dt\right\} \cdot dt \quad (11)$
	$\eta_4 \equiv N_4/N_{10} = \int_0^t k_4 \cdot \left[\int_0^t k_2 \cdot \exp\left\{\int_0^t (k_1 - k_2 - k_3 + k_4) \cdot dt\right\} \cdot dt\right] \cdot \exp\left\{-\int_0^t k_4 \cdot dt\right\} \cdot dt \quad (12)$
$k_i = \text{const.}$ $(i = 1, 2, 3, 4)$	$\eta_1 = \exp\{(k_1 - k_2 - k_3) \cdot t\} \quad (13)$
	$\eta_2 = \frac{k_2}{k_1 - k_2 - k_3 + k_4} \cdot [\exp\{(k_1 - k_2 - k_3) \cdot t\} - \exp(-k_4 \cdot t)] \quad (14)$
	$\eta_3 = \frac{k_3}{k_1 - k_2 - k_3} \cdot [\exp\{(k_1 - k_2 - k_3) \cdot t\} - 1] \quad (15)$
	$\eta_4 = \frac{k_2 \cdot k_4}{k_1 - k_2 - k_3 + k_4} \cdot \left[\frac{1}{k_1 - k_2 - k_3} \cdot [\exp\{(k_1 - k_2 - k_3) \cdot t\} - 1] + \frac{1}{k_4} \cdot \{\exp(-k_4 \cdot t) - 1\}\right] \quad (16)$

2.4.1.4 解析解

$N_i(t)$ は、基礎方程式の解析解として容易に求められ、無次元細胞数 η_i を Table 2.3 に示す. k_i が一定でない場合、例えば、環境因子が非定常変化し、 k_i が時間の関数である場合の解析解を式 (9)~(12) に示し、 k_i が一定の場合の解を式 (13)~(16) に示す.

2.4.2 モデル特性

2.4.2.1 パラメータスタディ

本章では、細胞の分化誘導開始後の比較的初期の段階を対象とするので、増殖や分化による細胞数の飽和傾向や細胞の死滅を考慮しない. この場合、 $k_3 = k_4 = 0$ で、細胞は全て生きており、 $\eta_t \equiv \eta_1 + \eta_2$, $\gamma \equiv \eta_2 / \eta_t$, J_1 , J_2 , $J_1 - J_2$ を含め、その解 (式(17)~(23)) を Table 2.4 に示す. 未分化細胞の増殖・分化の速度定数を表すモデル定数のパラメータスタディにより、モデル特性を調べるが、簡便化のために Table 2.4 中の式 (24) に示される無次元時間 と無次元速度定数 K を導入することにより、最終的に式(25)~(31)を用いる. Table 2.4 の解の分布の特徴は、 η_1, η_2 に含まれる係数 1 と $K/(1-K)$ に関して、 K の値により Table 2.5 に示す Case 1 から Case 6 の 6 通りに場合分けされ、各 Case の代表的な値 (6 個) に対して計算を行った.

2.4.2.2 モデル特性の結果

モデル特性として、各細胞数の時間変化 $\eta_1(\tilde{t})$, $\eta_2(\tilde{t})$, $\eta_t(\tilde{t})$, $\gamma(\tilde{t})$ の K に対する依存性を Fig. 2.9 に、 $\tilde{t} \rightarrow \infty$ における $\gamma(\tilde{t})$ の漸近値を K に対して Fig. 2.10 に示す.

- 1) 未分化細胞に関して、Fig. 2.9a 中、 $0 \leq K < 1$ の範囲では、 $\eta_1(\tilde{t})$ は指数関数的に増加した. $K = 1$ では、 $\eta_1(\tilde{t}) = 1$ (初期値) のままで一定となった. $K > 1$ の範囲では、 $\eta_1(\tilde{t})$ は時間に対して単調減少し零に漸近した.
- 2) 分化細胞に関して (Fig. 2.9b), $\eta_2(\tilde{t})$ は、 $0 < K < 1$ の範囲では指数関数的に増加し、 $K = 1$ では、直線的に増加した. $K > 1$ の範囲では、単調増加するものの、その増加は次第に緩速化し、 $K/(K-1)$ に漸近した.
- 3) 全細胞数に関して (Fig. 2.9c), $\eta_t(\tilde{t})$ は、 $0 \leq K < 1$ の範囲では指数関数的に増加し、 $K = 1$ では直線的に増加し、 $K > 1$ の範囲では $K/(K-1)$ に漸近的に増加した.
- 4) 分化率に関して、 $\gamma(\tilde{t})$ は、 $K > 0$ の範囲で単調増加しつつ、 $0 \leq K < 1$ の範囲では K に漸近し、 $K \geq 1$ の範囲では 1 に漸近した (Figs. 2.9d と Fig. 2.10).

Table 2.4 Analytical solutions for parameter study

$k_i = \text{const.}$ $(i=1, 2)$ $k_3 = 0,$ $k_4 = 0$	$\eta_1 = \exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} \quad (17)$	$\tilde{t} \equiv k_1 \cdot t, \quad K \equiv k_2/k_1 \quad (24)$
	$\eta_2 = \frac{k_2}{k_1 - k_2} \cdot [\exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - 1] \quad (18)$	$\eta_1 = \exp\{(1 - K) \cdot \tilde{t}\} \quad (25)$
	$\eta_t \equiv \eta_1 + \eta_2$	$\eta_2 = \frac{K}{1 - K} \cdot [\exp\{(1 - K) \cdot \tilde{t}\} - 1] \quad (26)$
	$= \frac{1}{k_1 - k_2} \cdot [k_1 \cdot \exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - k_2] \quad (19)$	$\eta_t = \frac{1}{1 - K} \cdot [\exp\{(1 - K) \cdot \tilde{t}\} - K] \quad (27)$
	$\gamma \equiv \frac{\eta_2}{\eta_t} = \frac{k_2 \cdot [\exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - 1]}{k_1 \cdot \exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - k_2} \quad (20)$	$\gamma = \frac{K \cdot [\exp\{(1 - K) \cdot \tilde{t}\} - 1]}{\exp\{(1 - K) \cdot \tilde{t}\} - K} \quad (28)$
	$J_1 = \eta_1 \quad (21)$	$J_1 = \eta_1 \quad (29)$
	$J_2 = (k_2/k_1) \cdot \eta_1 \quad (22)$	$J_2 = K \cdot \eta_1 \quad (30)$
	$J_1 - J_2 = \{1 - (k_2/k_1)\} \cdot \eta_1 \quad (23)$	$J_1 - J_2 = (1 - K) \cdot \eta_1 \quad (31)$

Table 2.5 Range of values of K for parameter study

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
Range of K	$K = 0$	$0 < K < \frac{1}{2}$	$K = \frac{1}{2}$	$\frac{1}{2} < K < 1$	$K = 1$	$1 < K$
Typical value of K in parameter study	$K = 0$	$K = \frac{1}{4}$	$K = \frac{1}{2}$	$K = \frac{3}{4}$	$K = 1$	$K = 2$

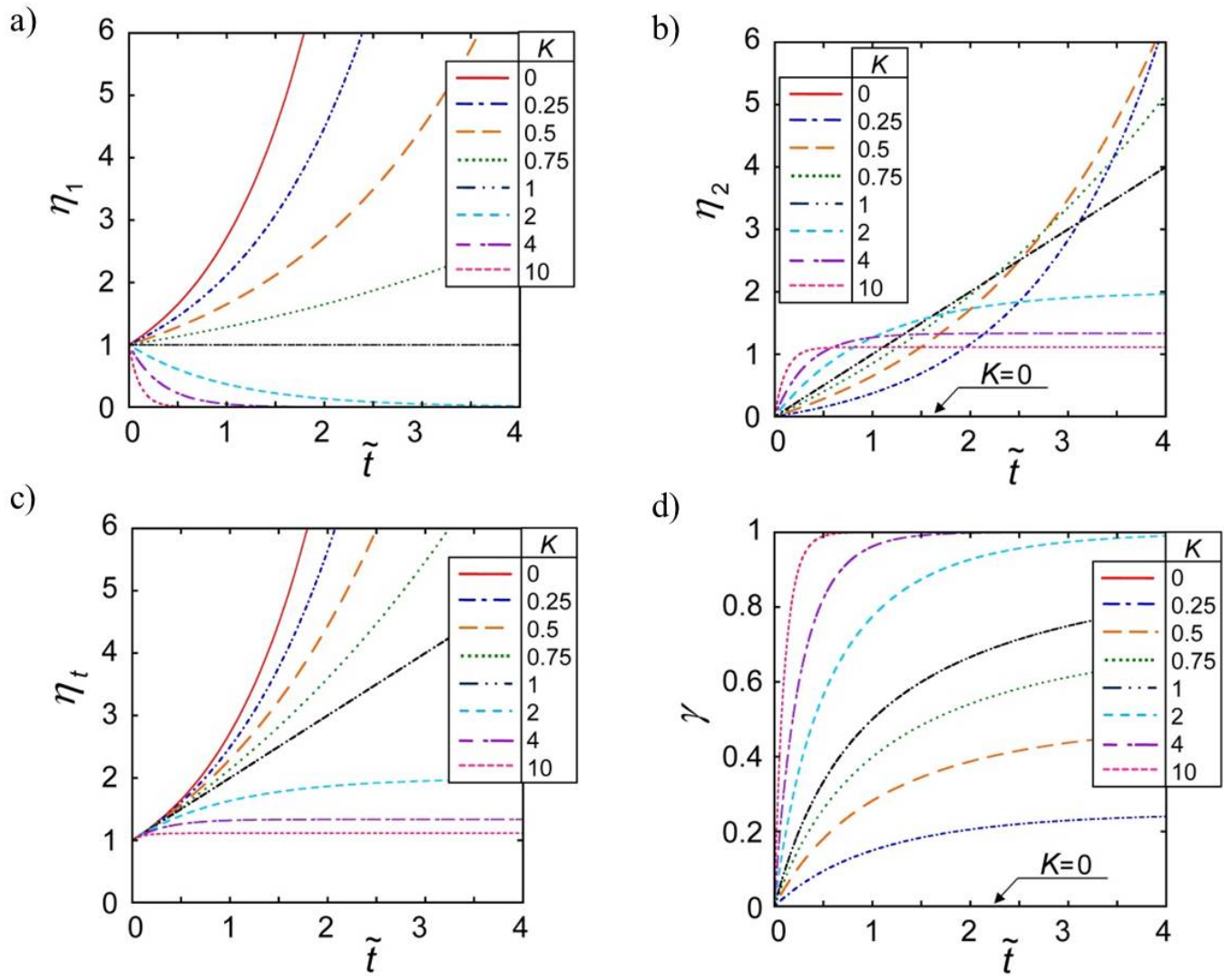


Fig. 2.9 Influence of K on η_1 , η_2 , η_t , and γ as a function of nondimensional time

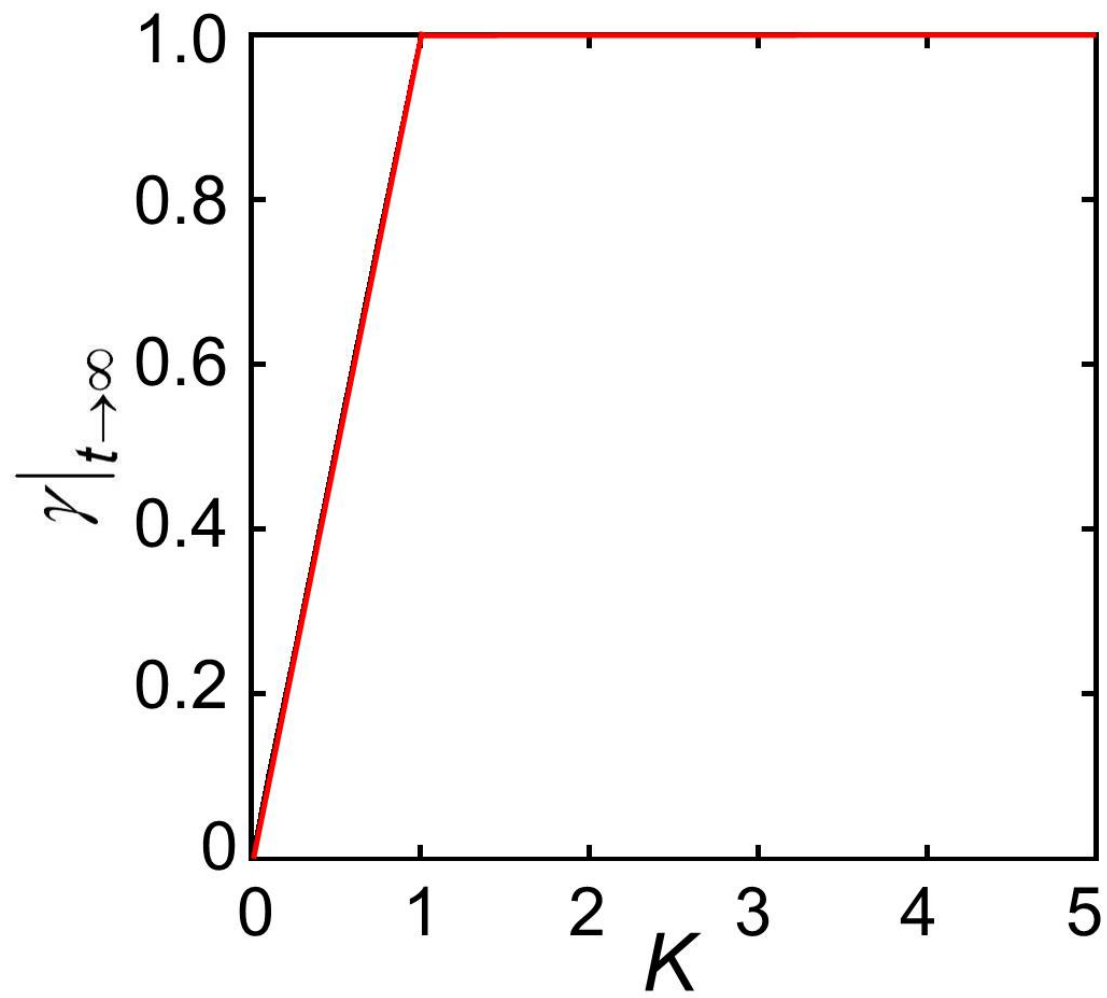


Fig. 2.10 $\gamma|_{t \rightarrow \infty}$ as a function of K

2.4.2.3 考察

2.4.2.3.1 各細胞数の時間変化に対する K の影響

1) 未分化細胞は、基本的に、その自己増殖と分化の両方を担うため、分化の発生により、時間経過に対する未分化細胞数の正味の増加は緩速化し、極端な場合には、分化が増殖を上回り、未分化細胞は減少する。 $0 \leq K < 1$ の範囲では、増殖による未分化細胞の増加が分化による未分化細胞の減少を上回る ($J_1 > J_2 \therefore J_1 - J_2 > 0$) ため、 $\eta_1(t)$ は、時間に対して指数関数的に増加する。 $K = 1$ では、未分化細胞の増殖による増加と分化による減少が等しく ($J_1 = J_2 \therefore J_1 - J_2 = 0$)、増殖した未分化細胞がすべて分化細胞になるため、 $\eta_1(t) = 1$ (初期値) のままで一定である。 $K > 1$ の範囲では、分化による未分化細胞の減少が、増殖による未分化細胞の増加を上回る ($J_1 < J_2 \therefore J_1 - J_2 < 0$) ため、 $\eta_1(t)$ は時間に対して単調減少し零に漸近する。従って、 K の増加に対して、 η_1 の値は単調減少する。

2) 分化細胞に関しては、分化の進行により、 $\eta_2(t)$ は、いずれの K の値 (> 0) でも、時間に対して単調増加する。 $0 < K < 1$ の範囲では、 $\eta_1(t)$ の指数関数的増加に対応して、 $\eta_2(t)$ も指数関数的に増加する。 $K = 1$ では、増殖と分化は等しい速さで進行し、 $\eta_1(t)$ が初期値と一定であるため、 $\eta_2(t)$ は直線的に増加する。 $K > 1$ の範囲では、 $\eta_1(t)$ が零に漸近的に減少するのに対応して、 $\eta_2(t)$ は単調増加するものの、その増加は次第に緩速化し、 $K/(K-1)$ に漸近し、最終的にはすべての細胞が分化した状態に至る。また、 η_2 の K に対する依存性は単調ではなく、分化する未分化細胞数に比べ、未分化細胞自体が十分に多く存在する場合には、 η_2 は K と共に増加するが、分化がある程度盛んで、未分化細胞数が減少すると、 η_2 は極大を経て、逆に、減少に転ずる傾向を示す。

3) 従って、両者の和である $\eta_t(t)$ も、いずれの K の値に対しても、時間に対して単調増加する。すなわち、 $\eta_t(t)$ は、 $0 \leq K < 1$ の範囲では指数関数的に増加し、 $K = 1$ では直線的に増加し、 $K > 1$ の範囲では $K/(K-1)$ に漸近的に増加する。基本的に、細胞分化は全細胞数の増加には寄与せず、全細胞数の増加は、あくまでも、未分化細胞数の増殖のみによりもたらされるため、 K の増加に対して $\eta_t(t)$ は単調減少する。

4) $\gamma(t)$ は、 $K > 0$ の範囲で、時間に対して単調増加しつつ、一定値に漸近する分布をもち、 K の増加に対しては単調増加する。 $\gamma(t)$ の漸近値は、 $0 \leq K < 1$ の範囲では K であるのに対して、 $K \geq 1$ の範囲では 1 であるが、後者では、 K の大きい方が早い段階 (t の小さい値) で一定値に漸近する。

2.4.2.3.2 各細胞数の時間変化の比較

上述の各細胞数の時間変化の K 依存性は、 K の値の 3 つの範囲に対して特徴づけられたが、 $\eta_1(\tilde{t})$, $\eta_2(\tilde{t})$, $\eta_t(\tilde{t})$, $\gamma(\tilde{t})$ の分布の特徴は、さらに、 $\eta_1(\tilde{t})$ と $\eta_2(\tilde{t})$ の相対的挙動の特徴により、 K の値 (表 5) に対して計 6 通りに場合分けされる。 K の各代表値に対する $\eta_1(\tilde{t})$, $\eta_2(\tilde{t})$, $\eta_t(\tilde{t})$, $\gamma(\tilde{t})$ の分布の比較を Fig. 2.11 に、 $J_1(\tilde{t})$, $J_2(\tilde{t})$, $J_1(\tilde{t})-J_2(\tilde{t})$ の分布の比較を Fig. 2.12 示す。

1) Case 1 ($K=0$) (Fig. 2.11a) では、未分化細胞は、増殖するだけで分化せず ($J_2=0$)、全ての細胞は未分化細胞で ($\eta_1=\eta_t$, $\eta_2=0$, $\gamma=0$)、指数関数的に増加する。

2) Case 2 ($0 < K < 1/2$) (Fig. 2.11b) では、 $\eta_2 < \eta_1 \leq \eta_t$ で、いずれも指数関数的に増加する。未分化細胞の増殖速さは、分化速さの 2 倍より速い ($J_1 > 2 \cdot J_2$)、すなわち、未分化細胞数の正味の増殖速さが分化速さより速い ($J_1 - J_2 > J_2$) ため、 $\eta_1 - \eta_2$ も指数関数的に増加し両者は交わらない。 γ は単調増加し K の値に漸近する。

3) Case 3 ($K=1/2$) (Fig. 2.11c) では、 $\eta_2 < \eta_1 \leq \eta_t$ で、いずれも指数関数的に増加するが、未分化細胞の増殖速さは分化速さの 2 倍に等しい ($J_1 = 2 \cdot J_2$)、すなわち、未分化細胞数の正味の増加は分化と等しい速さで進行する ($J_1 - J_2 = J_2$) ため、常に $\eta_1 - \eta_2 = 1$ で両者は交わらない。 γ は単調増加し $K=1/2$ に漸近する。

4) Case 4 ($1/2 < K < 1$) (Fig. 2.11d) では、いずれも指数関数的に増加する。未分化細胞の増殖速さは、分化速さの 2 倍より遅い ($J_1 < 2 \cdot J_2$)、すなわち、未分化細胞数の正味の増加は、分化に比べ遅い ($0 < J_1 - J_2 < J_2$) ため、分化細胞数は、途中で未分化細胞数を上回る。従って、 $\tilde{t} < \tilde{t}_c$ で $\eta_2 < \eta_1 \leq \eta_t$, $\tilde{t} = \tilde{t}_c$ で $\eta_2 = \eta_1 < \eta_t$ (η_1 と η_2 は交わる), $\tilde{t} < \tilde{t}_c$ で $\eta_1 < \eta_2 < \eta_t$ となる。 γ は単調増加し K の値に漸近する。

5) Case 5 ($K=1$) (Fig. 2.11e) では、未分化細胞の増殖速さが分化速さと等しく ($J_1 = J_2$)、すなわち、未分化細胞数の正味の増加速さが零であり ($J_1 - J_2 = 0$)、これは、増殖した未分化細胞が全て分化することを意味する。従って、未分化細胞数は初期値 ($\eta_1 = 1$) から変化しないのに対して、分化細胞数と全細胞数は、 $\eta_t - \eta_2 = 1$ を維持し、平行な直線で増加する。従って、 $\tilde{t} = \tilde{t}_c = 1$ で $\eta_1 = \eta_2 = 1$ である (η_1 と η_2 は交わる)。 γ は単調増加し $K=1$ に漸近する。

6) Case 6 ($1 < K$) (Fig. 2.11f) では、未分化細胞の増殖速さが分化速さよりも遅い ($J_1 < J_2$)、すなわち、未分化細胞数の正味の増加速さが負である ($J_1 - J_2 < 0$) ため、未分化細胞数 η_1 は減少し零に漸近するのに対して、分化細胞数と全細胞数は共に増加し一定値 $K/(K-1)$ に漸近する。従って、 η_1 と η_2 は $\tilde{t} = \tilde{t}_c$ で交わる。 γ は単調増加し 1 に漸近する。

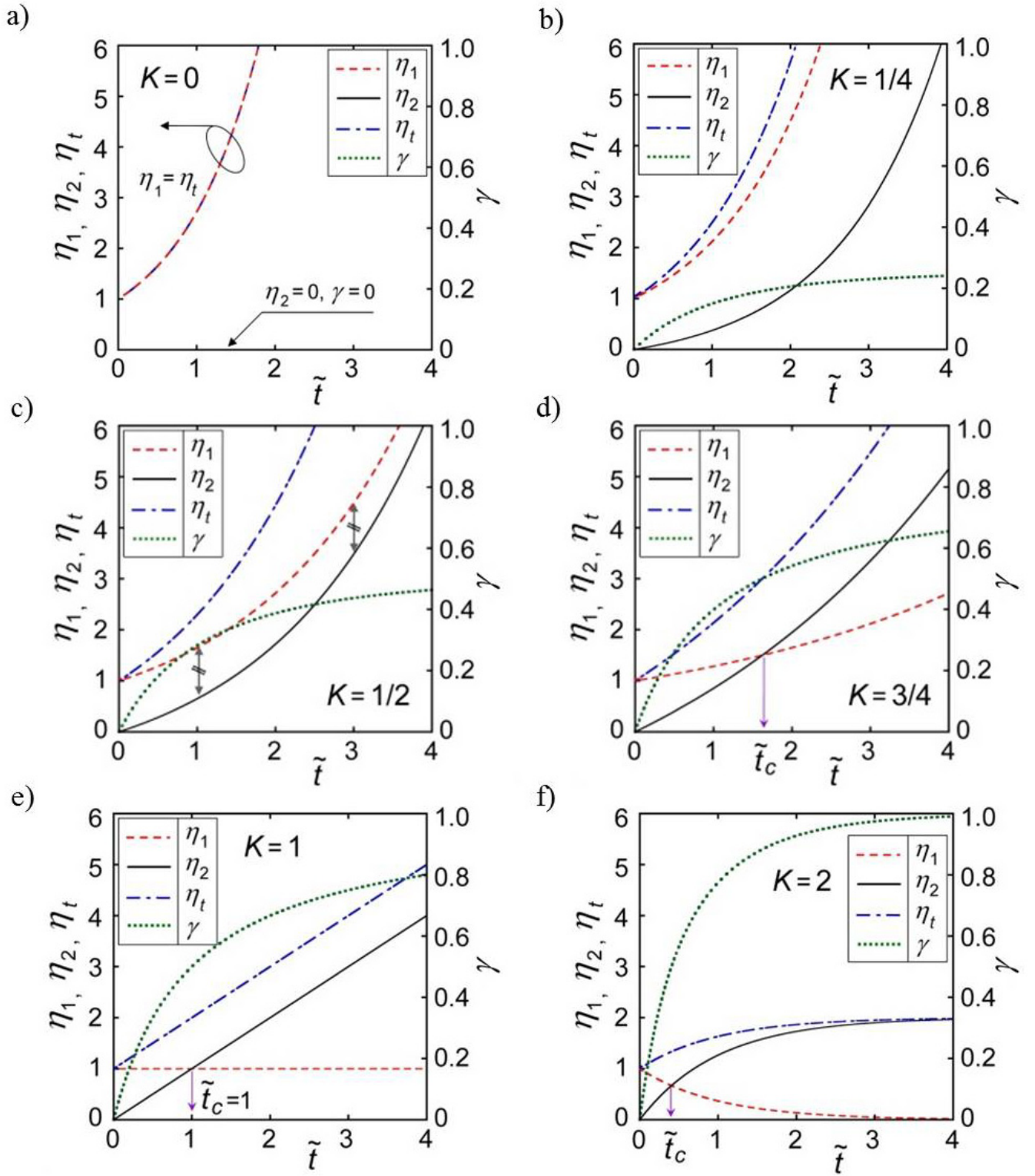


Fig. 2.11 η_1 , η_2 , η_t , and γ as a function of nondimensional time for typical values of K

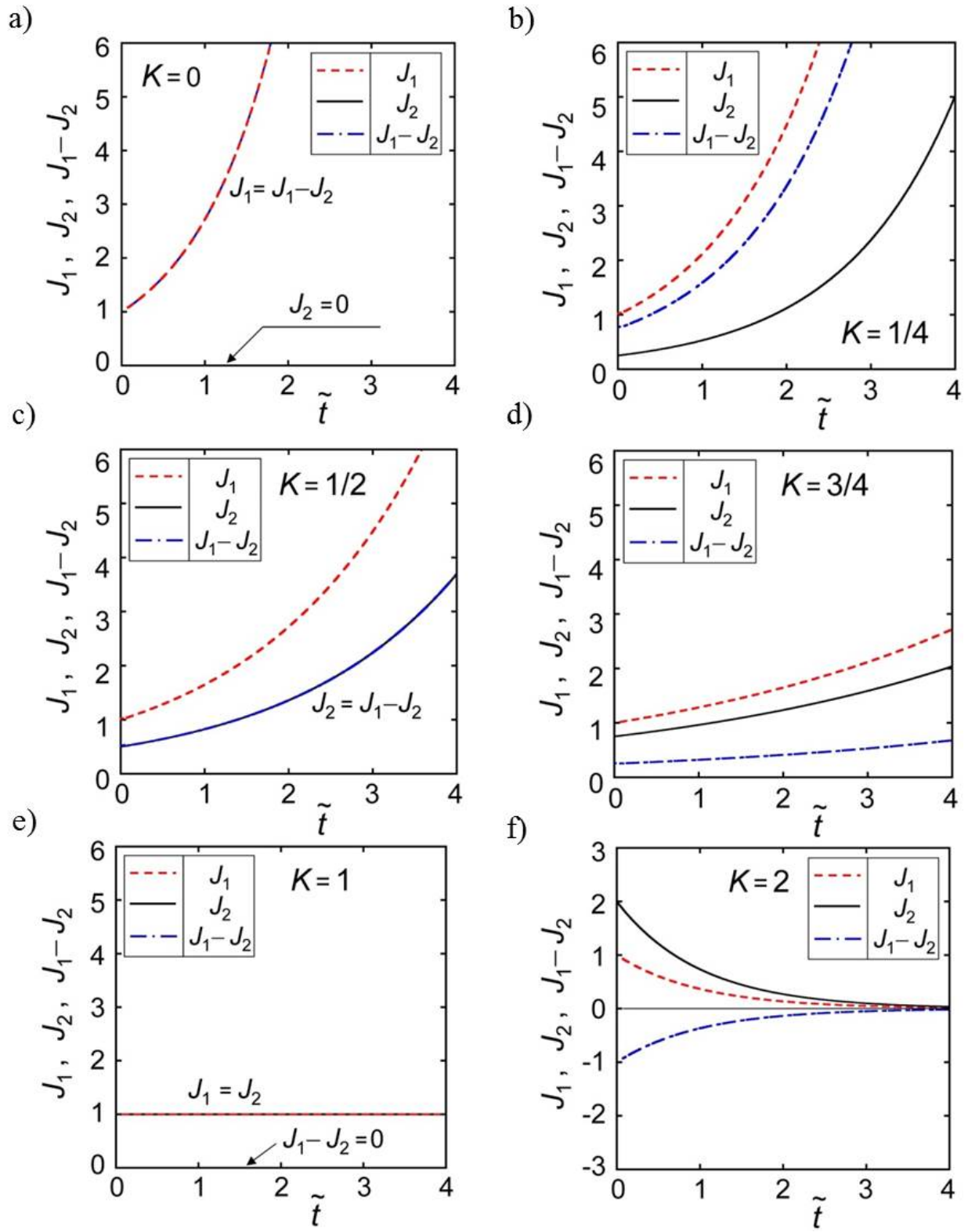


Fig. 2.12 J_1 , J_2 and J_1-J_2 as a function of nondimensional time for typical values of K

2.5 PC12 細胞の増殖と分化へのモデルの適用

「2.4」で提案・展開された数学モデルを、PC12 細胞の増殖と分化に適用する。すなわち、分化誘導開始後の未分化細胞と分化細胞の時系列変化に関して、「2.3」の実験結果に基づいた逆問題解析によりモデル定数を決すると共に、モデルによる計算値と実験値の比較を行うことにより、モデルの妥当性を検討する。

2.5.1 逆問題解析によるモデル定数の決定の方法

逆問題解析によりモデル定数 k_1 と k_2 を決定するが、逆問題解析ツールとして、MATLAB (Ver. 7.10.0.499) と Curve Fitting Toolbox (Ver.2.2) (The MathWorks 社製) を、非線形最適化法として Trust-Region 法を用いた。逆問題解析の具体的な手順としては、まず、1) Table 2.4 の式 (17) の逆問題解析から (k_1-k_2) を決定し、次いで、2) 1)の結果を式 (18) に代入後、逆問題解析から k_2 を決定し、最終的に、3) (k_1-k_2) と k_2 の値から k_1 を算出した。

なお、実験における接触障害を引き起こす細胞数密度の局所的な飽和傾向などの影響を避けるために、未分化細胞の増殖を伴う分化における逆問題解析では、分化誘導開始後 6 日目までの実験データを対象とし、未分化細胞の増殖のみの場合には、11 日目までの実験データを対象とした。

2.5.2 逆問題解析の結果

未分化細胞の死滅のみの場合 ($k_1 = k_2 = k_4 = 0$)、および、未分化細胞の増殖のみの場合 ($k_2 = k_3 = k_4 = 0$) の $\eta_1(\bar{t})$ の逆問題解析に基づく計算値を、各々、Figs. 2.3a と 2.3b に示す。Fig. 2.3a の曲線 ($k_3 = 0.422, 1/\text{day}$) は、時間に対して指数関数の形で単調減少し零の値に漸近するのに対して、Fig. 2.3b の曲線 ($C = 2.0 \text{ v/v\%}$ で $k_1 = 0.267, 1/\text{day}$, $C = 10.0 \text{ v/v\%}$ で $k_1 = 0.445, 1/\text{day}$) は、指数関数的に単調増加した。

細胞の増殖・分化が安定的に進行する場合の速度定数 k_1, k_2 、未分化細胞数の正味の時間変化を表す速度定数 (k_1-k_2)、現象を特徴づける因子である K の計算結果を血清濃度に対して Fig. 2.13 に示す。また、Figs. 2.13b と 2.10 から、血清濃度に対する $\gamma/t \rightarrow \infty$ をプロットした結果も Fig. 2.14 に示す。これらの図では、サイズの小さい白抜きのプロットは、各スポットで計測した細胞数の平均値 (Fig. 2.6) に対して逆問題解析を行った結果であり、サイズの大きい塗りつぶしたプロットは、スポットごとに逆問題解析を行い、平均値 \pm 標準誤差で表示したものである。両プロット間の差は、どのパラメータについても、ほとんど無かった。血清濃度の増加に対して、 k_1 は増加、 k_2 は減少し、その後、共にほぼ一定と

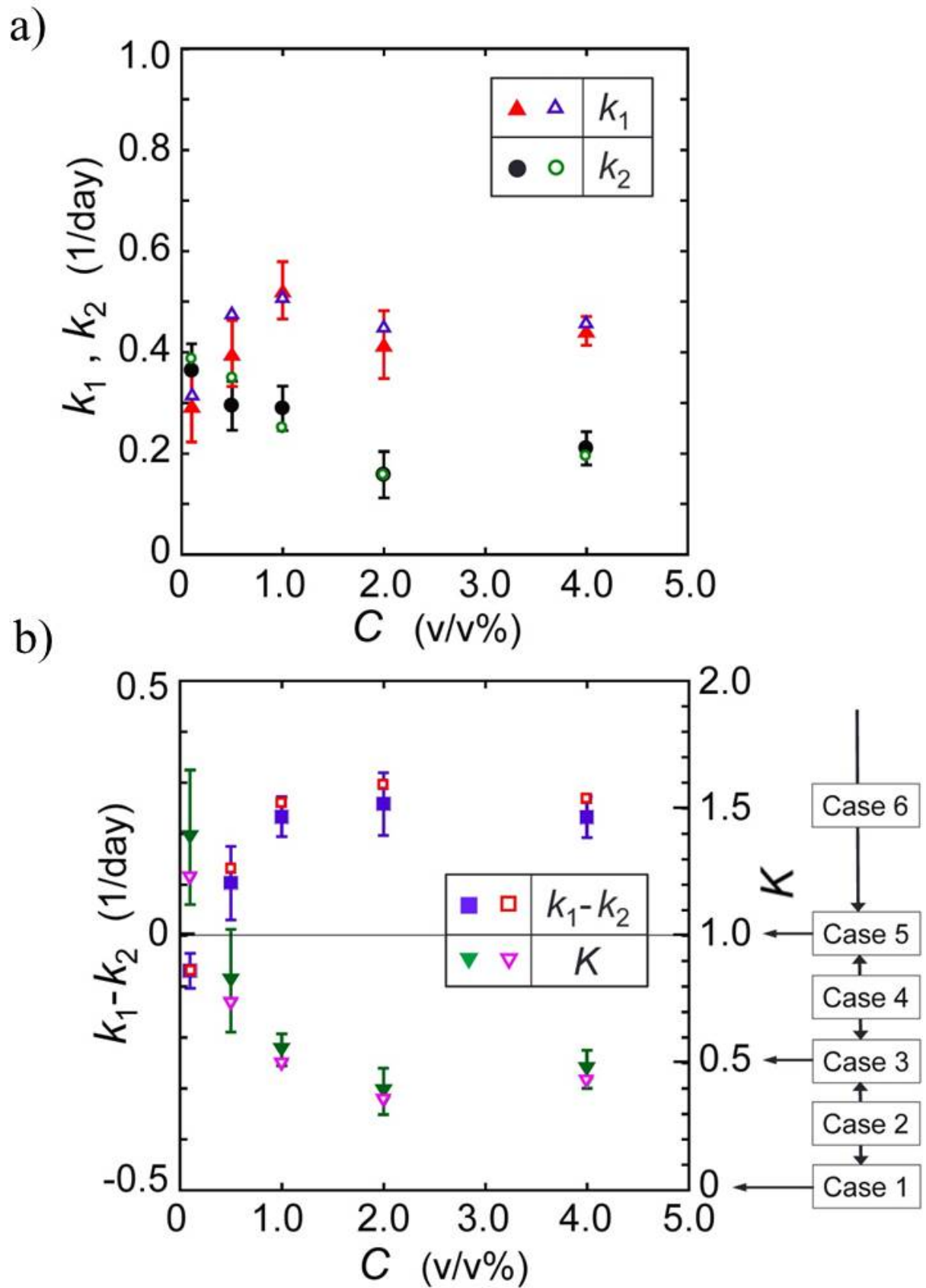


Fig. 2.13 Rate constants of growth and differentiation of PC12 cells determined by inverse problem analysis as functions of serum concentration

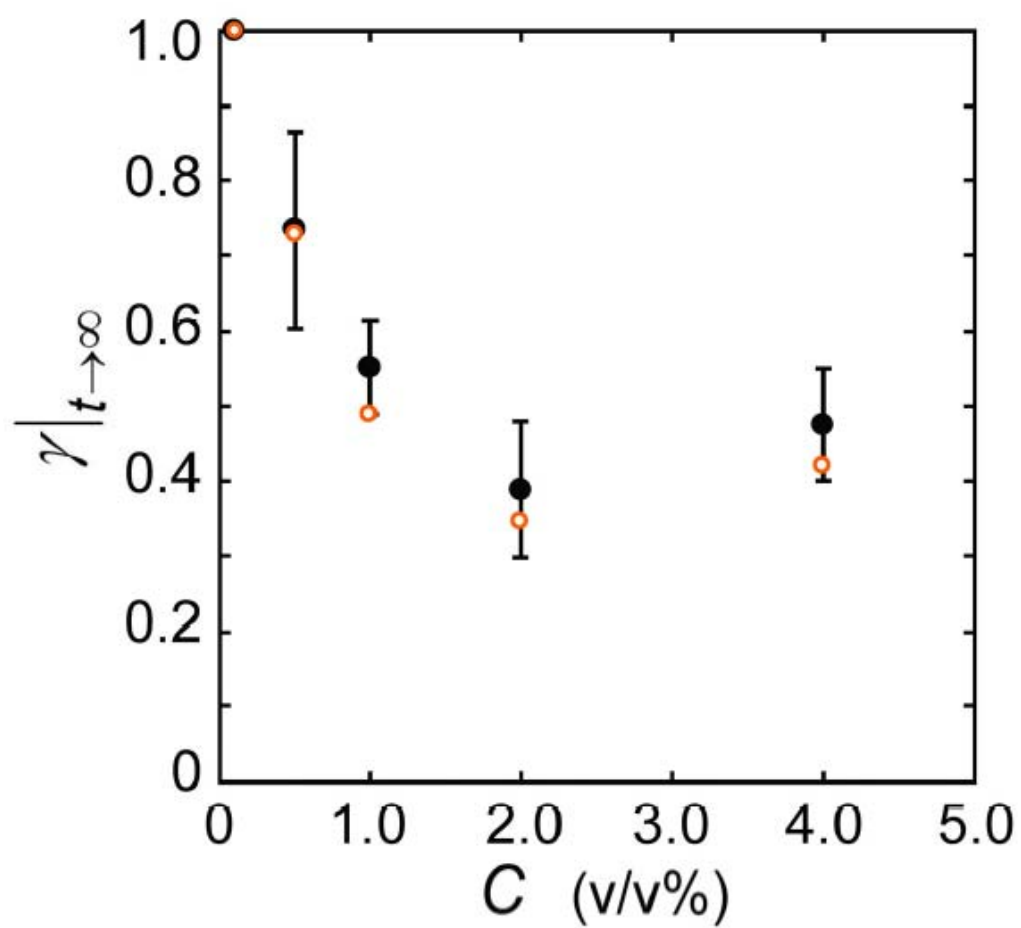


Fig. 2.14 $\gamma / \gamma_{t \rightarrow \infty}$ as a function of serum concentration

なった (Fig. 2.13a). また, (k_1-k_2) は増加, K は減少し, その後, 共にほぼ一定となった. 以上のモデル定数に基づいた, $\eta_1(\tilde{t})$, $\eta_2(\tilde{t})$, $\eta_t(\tilde{t})$, $\gamma(\tilde{t})$ の計算値を Fig. 2.6 に示す. $C = 2.0$ v/v% (Fig. 2.6d) では, $\eta_1(\tilde{t})$, $\eta_2(\tilde{t})$, $\eta_t(\tilde{t})$, は指数関数的に増加し発散傾向を示し, $\gamma(\tilde{t})$ は単調増加し K に漸近した. より血清濃度が低い $C = 0.5$ (Fig. 2.6b), 1.0 v/v% (Fig. 2.6c) の場合でも定性的には同様の傾向となった. 更に血清濃度の低い $C = 0.1$ v/v% (Fig. 2.6a) の場合では, $\eta_1(\tilde{t})$ は, 指数関数的に減少して零に漸近し, $\eta_2(\tilde{t})$, $\eta_t(\tilde{t})$ は指数関数的に増加し, 一定値 $K/(K-1)$ に漸近し, $\gamma(\tilde{t})$ は単調増加し 1.0 に漸近した.

2.5.3 考察

2.5.3.1 実験値とモデルによる計算値の比較

Fig. 2.3 における, η_1 の計算値と実験値の一致の程度は良い. Fig. 2.6a でも, 計算値と実験値は良く一致し, Figs. 2.6b~2.6d では, 逆問題解析の対象とした範囲 (分化誘導開始後 6 日位まで) で, 計算値と実験値の一致の程度は概して良い. また, Fig. 2.6 中, 逆問題解析の対象とした実験点の値 y_j^E と計算値 y_j^P に対して, 次式で定義する無次元残差を Table 2.6 に示す (n はデータ点数). Table 2.6

$$\sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n (y_j^E - y_j^P)^2} \left/ \left(\frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n y_j^E \right) \right.$$

の結果とを合わせると, 未分化細胞の正味の増加速さが正值, 負値の場合を問わず, モデルによる計算値は, 基本的に実験値の挙動を良く説明しており, モデルの妥当性が明確である.

なお, 分化誘導開始後 6 日程度以降では, 実験における各細胞数の増加は, 計算値に比べ緩速化傾向を示し, 特に, 分化細胞は, 未分化細胞に比べその傾向が強い. それに対応して分化率の実験値は減少傾向を示す. これは, 主に, 実験では, 接触阻害などによる細胞数密度の局所的な飽和傾向が原因で, 分化細胞は未分化細胞に比べ, その影響を受けやすいためと考えられる.

2.5.3.2 細胞増殖と分化の速度定数の血清濃度依存性

本実験の範囲では, 血清の効果は血清濃度の増加に対して飽和する傾向を示した (Fig. 2.13). 具体的には, 血清濃度の増加に対して, k_2 は単調減少するのに対して, k_1 は $C = 0.1$ v/v% で $k_1 < k_2$ の状態から増加し, $C = 0.5$ v/v% では $k_1 > k_2$ と逆転し, その後, $k_2 \sim 0.45, 1/\text{day}$, $k_1 \sim 0.2, 1/\text{day}$ でほぼ一定となる. Figs. 2.13a (白抜きのプロット) と 2.3b の間での k_1 の値の比較として, $C = 2.0$ v/v% の場合, NGF 添加の k_1 は, NGF 無添加のそれに比べ約 1.7 倍程度の値で, NGF 無添加の

Table 2.6 Nondimensional root mean square errors
between experiment and prediction based on inverse problem

$C, v/v\%$	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0
η_1	0.167	0.236	0.111	0.0753	0.416
η_2	0.119	0.246	0.0683	0.0594	0.0722
η_t	0.0804	0.115	0.0753	0.0558	0.301
γ	0.158	0.229	0.148	0.0978	0.373

$C = 10.0$ v/v%の値に近い. $(k_1 - k_2)$ は, 負値 ($C = 0.1$ v/v%で $-0.07, 1/\text{day}$) から正値へと増加し, 概して一定 ($\sim 0.25, 1/\text{day}$) となる. K は 1.0 を超える値から 1.0 未満へと減少し, ほぼ一定 ($\sim 0.4, 1/\text{day}$) となる.

Fig. 2.13b に白抜きの逆三角形で示す K の値から, 血清濃度の条件が $C = 0.1$ v/v%では Case6, $C = 0.5$ v/v%では Case4, $C = 1.0, 2.0, 4.0$ v/v%では Case2 に属することが分かる (塗りつぶしの逆三角形を基にすると, $C = 1.0$ v/v%ではわずかに 0.5 より大きく, Case4 に変化する). $\gamma_{t \rightarrow \infty}$ は $C = 0.1$ v/v%では 1 であるのに対し, $C \geq 0.5$ v/v%では K と等しくなる.

本モデルで定義された細胞増殖と分化の速度定数 k_1, k_2 は, 細胞固有の特性値 (培養条件に依存) と見なすことができ, 本モデルに則ることにより, 実験から直接得られない情報を含め, 細胞の増殖や分化の特性を的確に記述できる.

2.6 まとめ

未分化細胞の増殖を伴う分化特性を実験的に調べると共に、細胞数の時系列変化を数学的に記述するための反応速度論的モデルを展開し、モデル定数のパラメータスタディによりモデル特性を明らかにした。次いで、本モデルを細胞増殖・分化の実験結果に適用し、逆問題解析からモデル定数を決定し、実験値とモデルによる計算値との比較からモデルの妥当性を検討した。まともめは以下のとおりである。

- 1) NGF 無添加の場合の未分化細胞の増殖特性として、未分化細胞数の時系列変化に対する血清濃度の影響を定量的に明らかにした。本研究の範囲内では、未分化細胞は、低血清濃度 ($C \leq 0.5v/v\%$) では、上手く増殖せず生細胞数は減少するが、高血清濃度 ($C \geq 2.0v/v\%$) では安定的に増殖し、濃度が高い方がより盛んに増殖する。
- 2) NGF 添加の場合の未分化細胞の増殖・分化特性として、未分化・分化細胞数の時系列変化に対する血清濃度の影響を定量的に明らかにした。本研究の範囲内では、未分化細胞の安定な増殖と分化は、低血清濃度 ($C \leq 0.02v/v\%$) では実現しないが、高血清濃度 ($C \geq 0.1v/v\%$) では実現し、その定量的特性を調べ、血清濃度 $0.1v/v\%$ で分化率が最も高くなる。
- 3) 1) と 2) の実験結果の現象論的検討に基づいて、未分化細胞の増殖と分化における細胞数の時系列変化を、反応速度論的に定式化し、数学的に記述するモデルを展開し、基礎方程式とその解析解を求めた。
- 4) 3) の解の中に含まれる、細胞の増殖と分化の速度定数であるモデル定数のパラメータスタディを行った。本研究のモデル化の対象範囲内では、増殖や分化による細胞数の飽和傾向や細胞の死滅は無視できるとした。簡便化のため、無次元速度定数 K をモデルパラメータとし、その値により 6 通りに場合分けし、モデル特性（未分化細胞数、分化細胞数、全細胞数、分化率の時系列変化に対する K の影響）を詳細に明らかにした。
- 5) 本モデルを 1) と 2) の実験結果に対して適用し、細胞数の時系列変化の実験値とモデルによる計算値に基づいた逆問題解析からモデル定数を決定すると共に、計算値と実験値を比較した。未分化細胞の正味の増加速さが、正值、負値の場合を問わず、モデルによる計算値は、基本的に、実験値の特性を良く模擬できることより、モデルの妥当性を示した。
- 6) さらに、本モデルで定義した細胞の増殖・分化の速度定数を、細胞固有の特性値として見なし、本モデルを通して、細胞数の時系列変化とその血清濃度依存性などの細胞の増殖・分化特性を数学的に記述できることを示した。

第 3 章

生理食塩水中における 神経様細胞の凍結・融解特性

3.1 緒言

細胞や組織などの生体材料を凍結により長期間保存する凍結保存は、現在、血球、精子、胚などの遊離・単一細胞、および、皮膚、軟骨などの限られた組織に対し、ある程度適用可能であり、医療や農業などの幅広い分野で利用されている^{(3.1)(3.2)}。細胞や組織の凍結・融解後の生存性は、凍結保存技術の重要な評価指標であり、一般に、注目した特定の機能の凍結前後の保持割合として定義されるが、当該生体材料の種類、冷却速度、加温速度、保存温度、凍結保護物質の種類と濃度などの条件に依存することが知られている^{(3.3)(3.4)}。これらの熱的操作因子は、直接的には細胞スケールでの細胞周りの微視的構造である未凍結水溶液や氷結晶の状態、氷結晶と細胞の相互作用の特性を決定し、さらには、水、氷、生体高分子の構造に分子レベルで影響を及ぼし、結果として生体材料の生存性を決定すると考えられる^(3.5)。しかし、その詳細な損傷や保存のメカニズムは必ずしも十分には解明されておらず、現状における凍結対象や凍結保存条件は限定的であり、それらの拡大のためには、種々の生体材料の凍結・融解過程における微視的挙動と融解後の生存性との関連性について、より詳細な情報を得ることが重要である^{(3.6)(3.7)}。

神経細胞の凍結保存に関しては、再生医療における細胞移植療法や創薬時の薬・毒物スクリーニングにおける細胞準備の効率化などを目的とし、これまで主に懸濁液の状態の神経突起を持たない細胞（未分化細胞や懸濁により突起を失った細胞）を対象に研究されてきた^(3.8-3.13)。スクリーニングにおける神経細胞の準備では、現在、新鮮、または、凍結保存された初代神経細胞の懸濁液や新鮮な神経組織の切片が用いられているが、細胞懸濁液としての神経細胞の場合には、実験に使用する前に、分化誘導・神経突起伸長・神経ネットワーク形成の過程が必要となり煩雑である。もし、*in vitro* でネットワークを形成させた細胞群を、そのままの状態での凍結保存が出来れば、神経細胞を用いたスクリーニングの大幅な効率化が実現できると考えられる。また、新鮮な神経組織の薄切片も汎用されるが、これを凍結保存した組織に置き換えることが出来れば、非常に便利であり、その場合には *in vivo* での神経ネットワークの維持が要求される。

Ma ら^(3.14)は、マウス胎児脊髄由来初代神経細胞を採取後、*in vitro* で7日間培養し、神経ネットワークを形成させ、細胞をディッシュに接着させたまま凍結実験を行った。神経ネットワークを形成した細胞を、35mM トレハロースを添加した培養液中でさらに24時間培養後、10v/v%DMSOを添加した培養液に交換し、細胞をコラーゲンゲルに包埋する場合と包埋しない場合で比較した。冷却速度

が $H=1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の緩速凍結で、液体窒素中で 2 か月間保存し、急速融解した。融解後、コラーゲンゲルに包埋した場合の方が、コントロールよりも、細胞膜の色素排斥能に基づいた生存率が約 2 倍程度高かった。さらに、持続的な情報伝達のために必要なシナプス小胞のリサイクリングも、コラーゲンへの包埋を行った群でのみ観察された。同様の実験系で、Malpique ら^(3.15)は、材料として神経様細胞へ分化誘導したマウス神経芽細胞腫由来細胞株 (N2a 細胞) を用い、包埋するゲルとしてアルギン酸塩ゲルを用いた。10v/v% DMSO を添加した溶液中で緩速凍結 ($H=1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) し、 -80°C で 1~2 週間保存した。融解後、ゲルに包埋する場合の方が、コントロールよりも細胞内酵素活性に基づく生存性が 3 倍程度上昇することを示した。

また、Pichugin ら^(3.16)は、ラットの海馬組織の切片 (厚さ $475\mu\text{m}$) に対して、ガラス化保存と緩速凍結保存の比較を行った。ガラス化保存では、61w/v% の凍結保護物質 (DMSO, ホルムアミド, エチレングリコール, ポリビニルピロリドンなどの混合) を含むガラス化液と平衡させ、液体窒素で冷却されたアルミニウム製のブロックに接触させることで、 -130°C まで冷却し、3~7 分維持した。その後、 -10°C のガラス化液に浸漬することにより、急速に加温した。緩速凍結保存では、30v/v% のグリセロールを含んだ溶液で、約 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で凍結し、 -20°C まで到達後、即座にウォーターバスで融解した。融解後、切片全体から抽出した K^{+} と Na^{+} の濃度比を生存性の指標として評価した場合、ガラス化保存の方が、緩速凍結保存に比べ、その生存性が向上し、非凍結の場合の 90% 以上まで到達することを示した。

しかし、このような研究はまだ少なく、未解明な点も多い。例えば、神経ネットワークの電気生理的機能の正常性に関する検討はまだほとんどなされていない。また、細胞レベルでの詳細な凍結・融解挙動や、生存性に対する冷却条件の影響などの基礎的な点も調べられていない。

本章では、神経ネットワーク形成に必要な神経突起を有する神経様細胞に対して、まずは、生理食塩水中で凍結実験を行い、神経細胞の凍結に関する基礎的特性を理解することを目的とする。神経細胞は、薬理効果を調べる創薬分野で実験材料として応用上必要不可欠であり、また、細胞体から多数の細長い神経突起が伸びるという特徴的な形態を持つため、形態学的な基礎的観点からも興味深い。さらに、本研究は、凍結手術において、破壊する対象の細胞の周囲でネットワークを形成している神経細胞に対する凍結の影響を理解する観点からも重要である^(3.17)。

まず、冷却条件を変化させ、1) 凍結様式、氷結晶の形態、氷結晶と細胞の相互作用などの凍結挙動を明らかにする。次いで、凍結・融解後に、2) 細胞の形態変化を調べ、その主要な変化である神経突起の数珠状化と短小化を定量的に評価し、3) 免疫細胞化学染色を用いることにより、細胞骨格（中間径フィラメント）の変化特性も調べると共に、4) 形態変化に及ぼす浸透圧ストレスの影響を調べる。さらに、5) 細胞膜の色素排斥能の評価に基づいて、細胞の生存性を計測する。以上の結果を踏まえ、これらの特性の関連性についても検討する。なお、実験材料としては、基質に付着した分化型 PC12 細胞を用い、2 章の結果から、分化率が最も高く、実験材料の準備が効率的に行える条件として、分化誘導過程における培養液中の血清濃度を 0.1v/v% とする。

3.2 実験材料およびその準備

3.2.1 実験材料（細胞）

第 2 章で増殖・分化特性を調べた神経細胞モデルである PC12 細胞を用いた。

3.2.2 PC12 細胞の継代培養と分化誘導

継代培養は、「2.2.2」項の方法と同様である。

未分化型 PC12 細胞の分化誘導法を以下に述べる。まず、コラーゲンをコーティングしたチャンバースライド (CS) (4wells, 底面厚さ 1.0mm, 培養領域 8.9 × 20.2mm, ポリメチルペンテン, Thermo Fisher Scientific 社製, アメリカ) (Figs. 3.1 と 3.2), またはディッシュ内に設置したプラスチックカバースリップ (PCS) (厚さ 170~200 μ m, 直径 13mm, ポリフェニレンサルファイド, Thermo Fisher Scientific 社製, アメリカ) (Fig. 3.3) に, 継代培養過程の細胞を, 約 1500cells/cm² の細胞数密度で播種し, 継代培養時の培地で, 37°C, 10%CO₂ 環境下で培養する。培養開始から 24 時間後, 0.05v/v% FBS, 0.05v/v% HS, 100ng/ml NGF (Nerve Growth Factor-7S from murine submaxillary gland, Sigma-Aldrich 社製, アメリカ) を添加した DMEM に培地を替え, その後 1 日おきに同培地で培地交換する。NGF 添加後 24 時間以内に, 細胞は分化を開始 (扁平化し, 神経突起を伸長させ始める細胞が出現) し, 時間経過と共に, 長い突起を持つ細胞の割合が増加する。細胞体よりも長い突起を持つ分化細胞数の割合が, 全細胞数の 80% 以上に及ぶ, NGF 添加後 6~10 日の細胞を凍結実験用の試料とした。

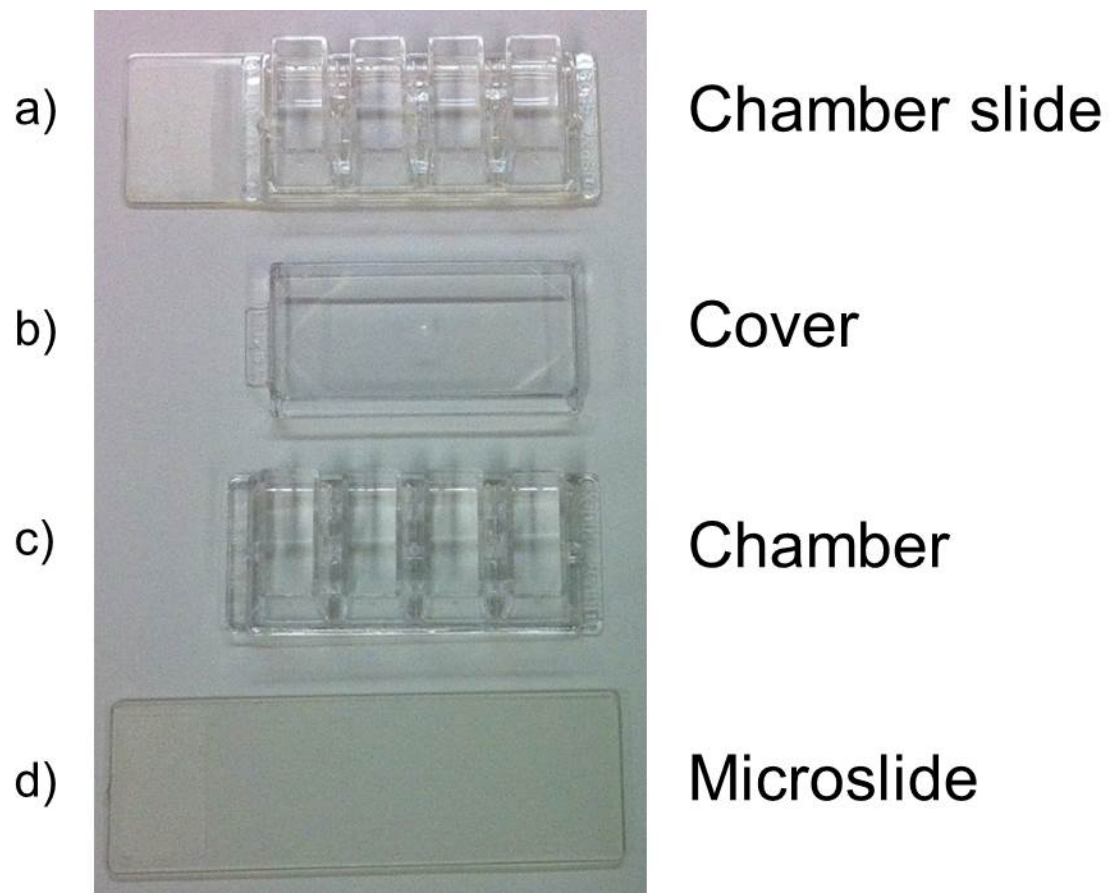
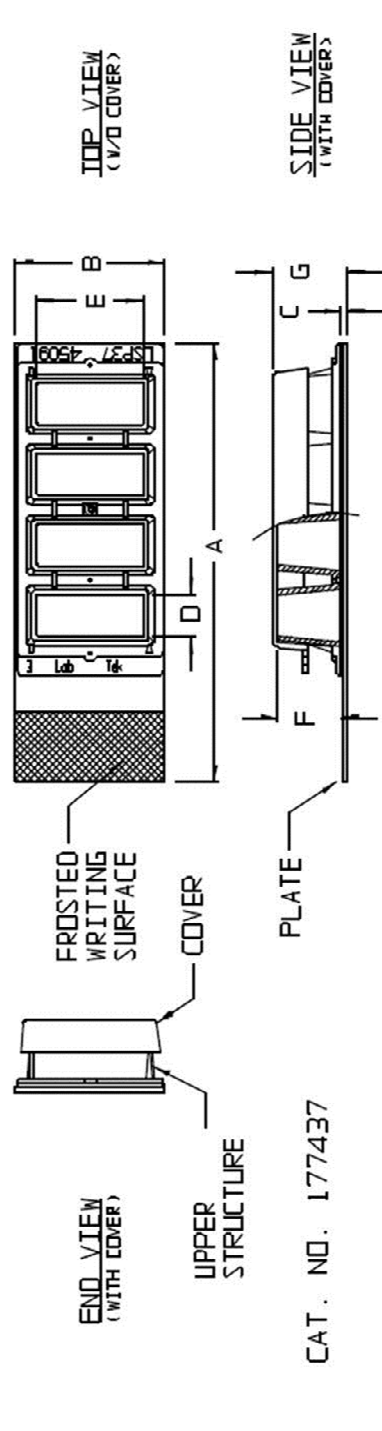


Fig. 3.1 Outlook of chamber slide and each parts of that (4well)



CATALOG NUMBER.....:		177437
NO. OF WELLS.....:		4
SUGGESTED WORKING VOL. (mL).....:		0.5 - 0.9
CULTURE AREA WELL/cm.....:		1.8 = 0.89 x 2.02
MATERIALS	COVER.....:	PS
	UPPER STRUCTURE.....:	PS
	SLIDE.....:	PERMANDX®
		INCHMM
A (SLIDE LENGTH).....:		2.9875.7
B (SLIDE WIDTH).....:		1.0225.9
C (SLIDE THICKNESS).....:		0.041.0
D (WELL LENGTH).....:		0.277.0
E (WELL WIDTH).....:		0.7218.3
F (WELL INSIDE HEIGHT).....:		0.4311.0
G (OVERALL HEIGHT).....:		0.5113.0

Fig. 3.2 Schematic and size of chamber slide (4well)

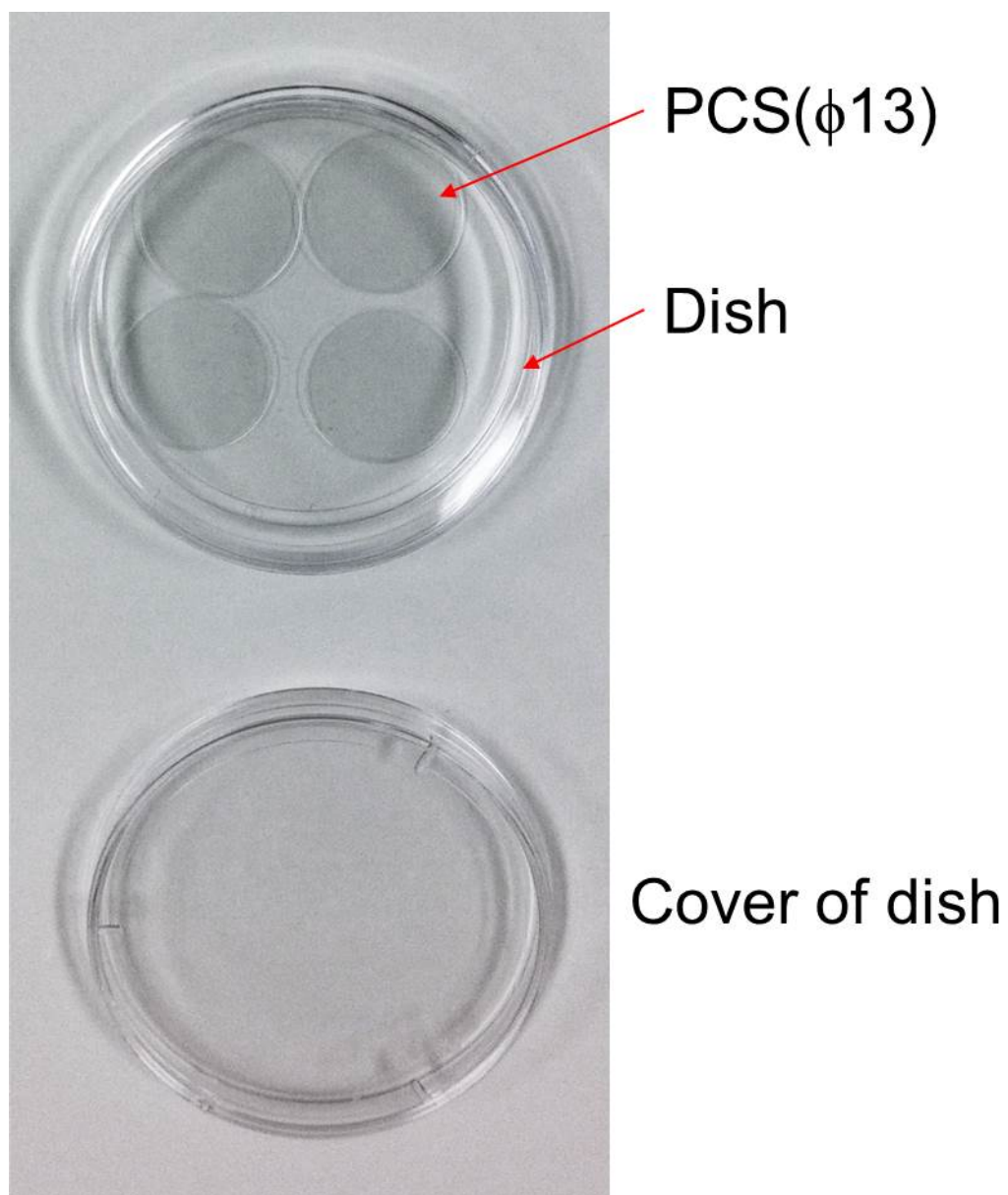


Fig. 3.3 Outlook of plastic coverslip in culture dish

3.3 実験装置および方法

3.3.1 凍結・融解のための低温ステージ

試料の凍結・融解には、顕微鏡に装着される 2 種類の低温ステージを用いた。すなわち、方向性凝固ステージ (DSS) ^{(3.6)(3.18)} (Figs. 3.4 と 3.5), および、一様温度分布ステージ (UTDS) (10002L, Linkam 社製, イギリス) (Figs. 3.6 と 3.7) である。

Fig. 3.5 に示すように、方向性凝固ステージの高温側と低温側の二つの銅ブロックの間隔は 2.0 mm であり、実験試料は、ステージ上で温度勾配 G が課された状態で、高温側から低温側へ、移動速度 V で移動させられることにより、冷却速度 $H = G \cdot V$ で冷却され、試料内を凍結が進行する。試料の逆方向への移動により、加温速度 $W = G \cdot V$ で加温され、融解が進行する。実験試料の直線的な移動は、直流可変電圧により駆動される直流小型モータとラック・アンド・ピニオンを用い、回転運動を直線運動に変換することにより行われる。本ステージ上では、試料が連続的に移動するため、試料の観察部の凍結の際に、植氷が不要であると共に、一度の実験で多くの細胞の凍結挙動に注目できる。しかし、次に述べる一様温度分布ステージの場合に比べ、特に、低冷却速度の条件では、凍結・融解にかかる時間が長くなり、また、試料中の時系列での定点観察が可能な領域が制限される特性を持つ。

一方、Fig. 3.7 の概略図に示すように、一様温度分布ステージは、直径 21mm の銀製の円盤形（中心に、直径 2.0 mm の光路用の貫通穴を有する）で、実験試料は、ステージ上に固定されるため、凍結・融解過程を通して、試料全体が空間的に一様温度で冷却・加温されると共に、定点観察が、凍結・融解過程において時系列で出来る。しかしながら、試料の凍結開始時には、毎試料で植氷が必要である。本研究では、ステージ上の試料温度が $-0.4 \sim -1.0^{\circ}\text{C}$ の状態で、液体窒素に浸漬したステンレス製のヘラ（肉厚 0.85mm）の先端を、試料ガラスカバー上面の端部に接触させることにより植氷した。

いずれのステージの場合も、試料底面とステージ上面間の間隙に微量のエタノールを注入することにより、両者の間の良好な熱的接触を得た。また、試料内に設置したクロメル・アルメル熱電対（素線径 0.1mm および 0.05mm）とデータロガー（サーモダック F, 江藤電気社製, 日本）による温度測定から、実験試料が実際に経験する冷却速度と加温速度を決定した（付録 C）。

3.3.2 凍結挙動の観察

CS 上の付着した分化型 PC12 細胞に対して、培地（約 300 μl ）を除去し、生

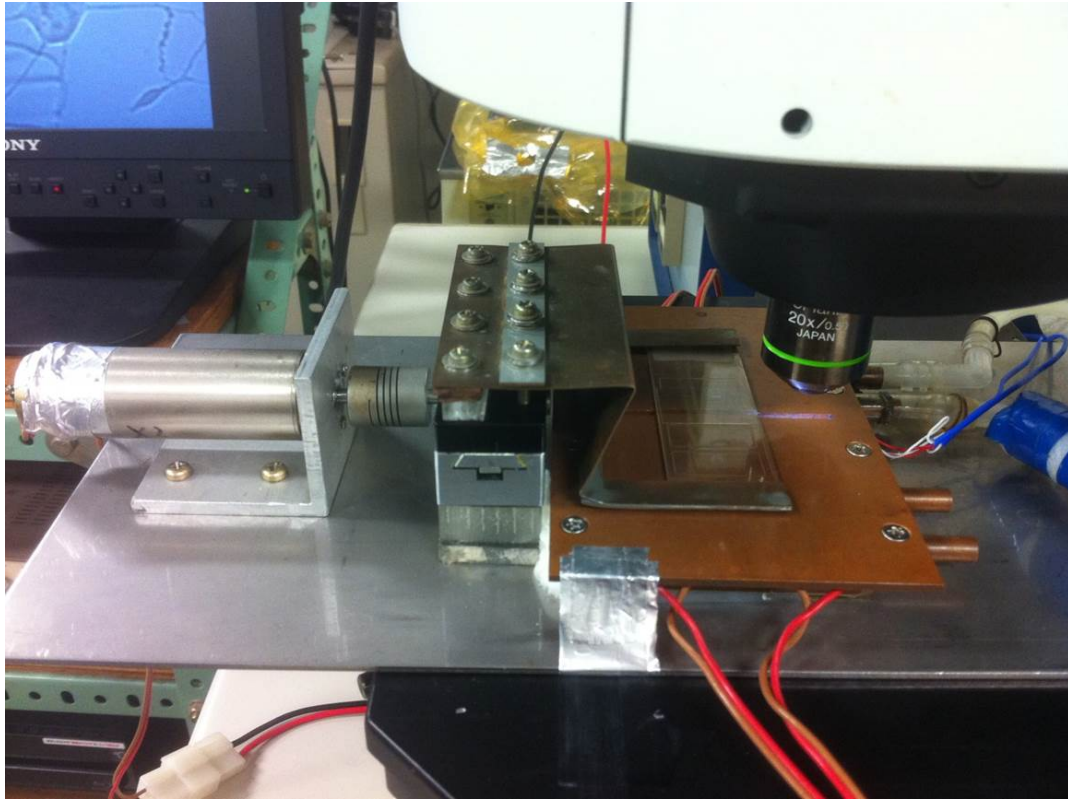


Fig. 3.4 Outlook of DSS

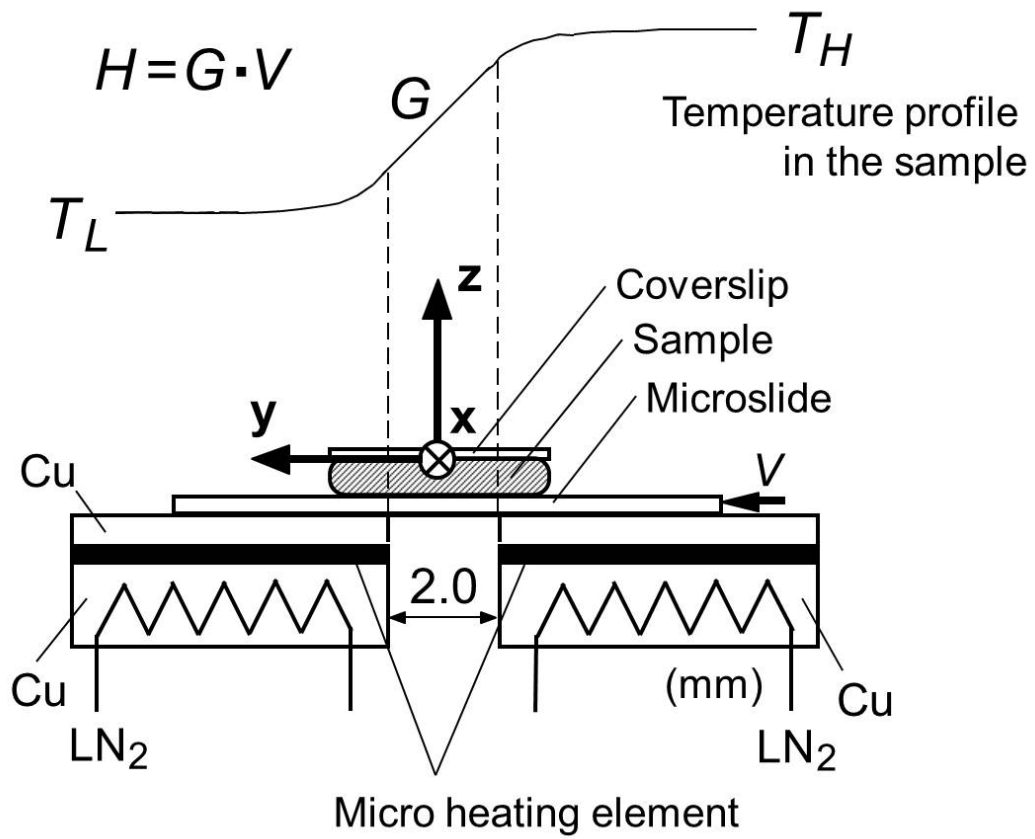


Fig. 3.5 Schematic of DSS

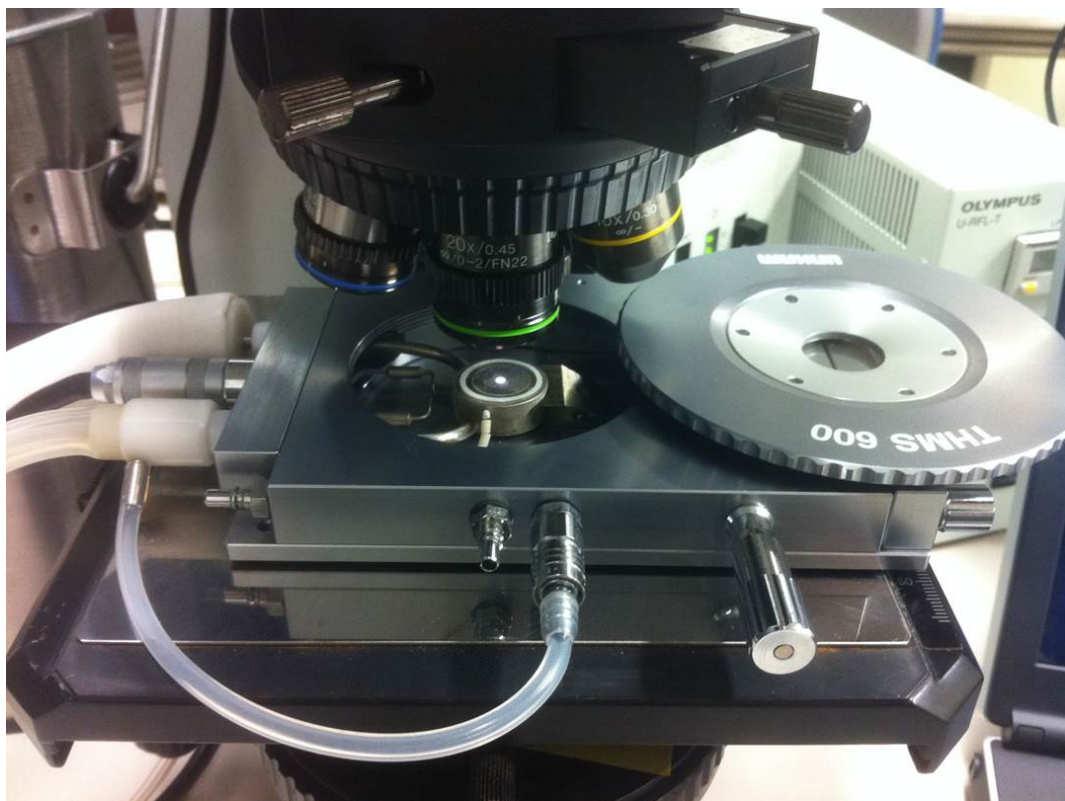


Fig. 3.6 Outlook of UTDS

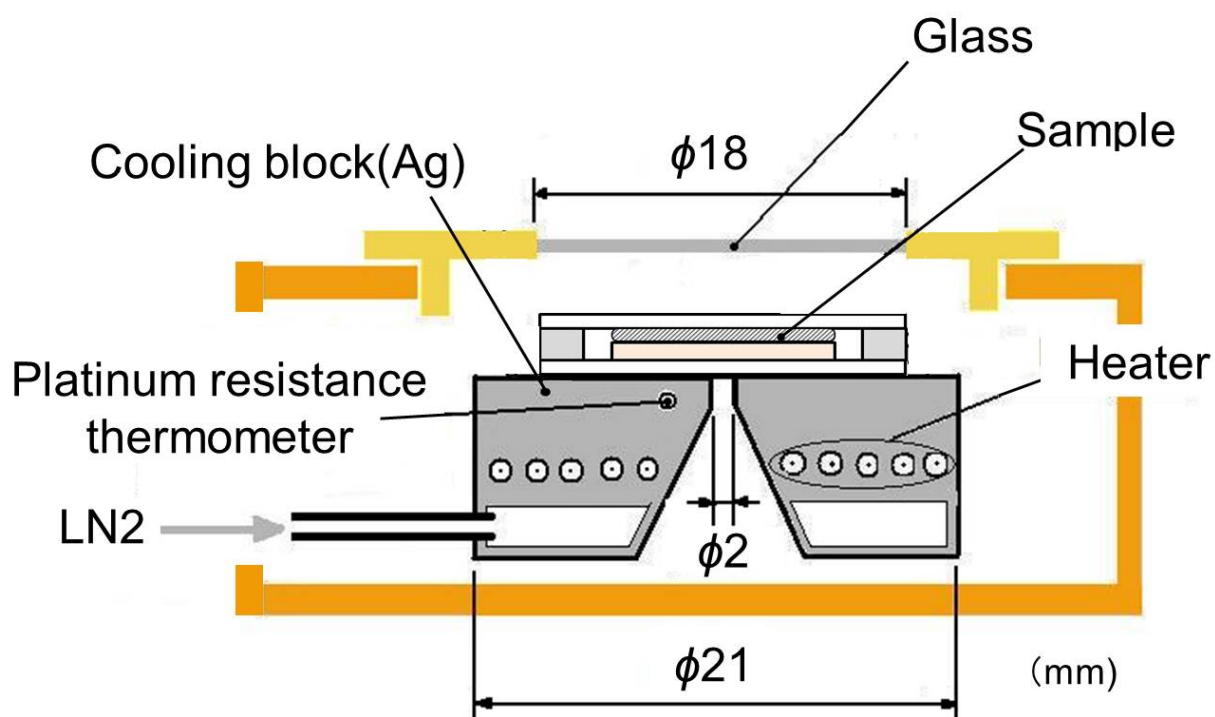


Fig. 3.7 Schematic of UTDS

理食塩水 (PS) (NaCl 0.154M, 大塚製薬工場社製, 日本) を用い, 洗浄 (同量の生理食塩水を加え, 約 1 分間放置し, 除去) を 2 度行った. その後, CS の側壁を取り外し, CS を傾斜させ, 残留水溶液を除去した後, PS を約 15 μl 加え (附着細胞と PS から成る試料で 20 μl 相当), その上からガラスカバースリップ (GCS) (厚さ 120~170 μm , 18 \times 24mm, ホウケイ酸ガラス, 松浪硝子工業社製, 日本) で覆い, 凍結挙動観察のための試料 (厚さ約 45 μm) (Fig. 3.8) とした. この試料を, 正立顕微鏡 (AX70, OLYMPUS 社製, 日本) に装着した方向性凝固ステージ上で凍結させ, その挙動を, 3CCD カメラ (XC-003, SONY 社製, 日本) とブルーレイディスクレコーダー (BDZ-RX100, SONY 社製, 日本) を用い, 撮影・記録した (Fig. 3.9). 温度条件は, 温度勾配 G が約 13~19 $^{\circ}\text{C}/\text{mm}$ に対して, 試料の移動速度 V (0.4~4.9mm/min) を変化させ, 冷却速度 $H = 5.4, 33.6, 68.4, 92.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ とした.

3.3.3 凍結・融解後の細胞の形態変化の観察と生存率の測定

凍結・融解後の細胞に関して, 形態変化の観察と生存率の測定を同時に行った. 主に方向性凝固ステージを用いたが, 本実験条件で最も低い冷却速度である $H = 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合や, 凍結・融解過程における時系列の観察には一様温度分布ステージを用いた.

3.3.3.1 方向性凝固ステージを用いる場合

CS 上の分化型 PC12 細胞に対して, 培地を, 蛍光色素である Propidium Iodide (PI) (最大励起光波長 535nm, 最大蛍光波長 617nm, Life Technologies 社製, アメリカ) を 2 μM 添加した生理食塩水に交換し, それ以降, 「3.3.2」項と同様の手順で試料を準備した. 試料は, 方向性凝固ステージにより, 所定の冷却速度で最低到達温度まで冷却され, そこで 10 分間滞在後, 所定の加温速度で融解された. 冷却条件は, 最低到達温度 5 通り ($T_L = -0.8, -3.8, -5.6, -8.3, -11.2^{\circ}\text{C}$) に対して, 冷却速度を約 1.5 から 80.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の範囲で変化させた. 加温条件は, 加温速度 $W = 20\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で, 20 $^{\circ}\text{C}$ まで加温した. 融解終了後 5~20 分の間に, 20 $^{\circ}\text{C}$ で, 倒立顕微鏡 (DMIRB, Leica Microsystems 社製, ドイツ) と CCD カメラ (DP50, OLYMPUS 社製, 日本) を用い, 位相差画像と蛍光画像を撮影した. 凍結前にも等しいスポットで同一の細胞に対する同様の撮影を行い, 凍結前と凍結・融解後の同一の細胞の比較を可能にした. なお, 本研究では, 方向性凝固条件の設定として, 当該ステージの高温側と低温側のブロック間隔が 2.0mm と固定され

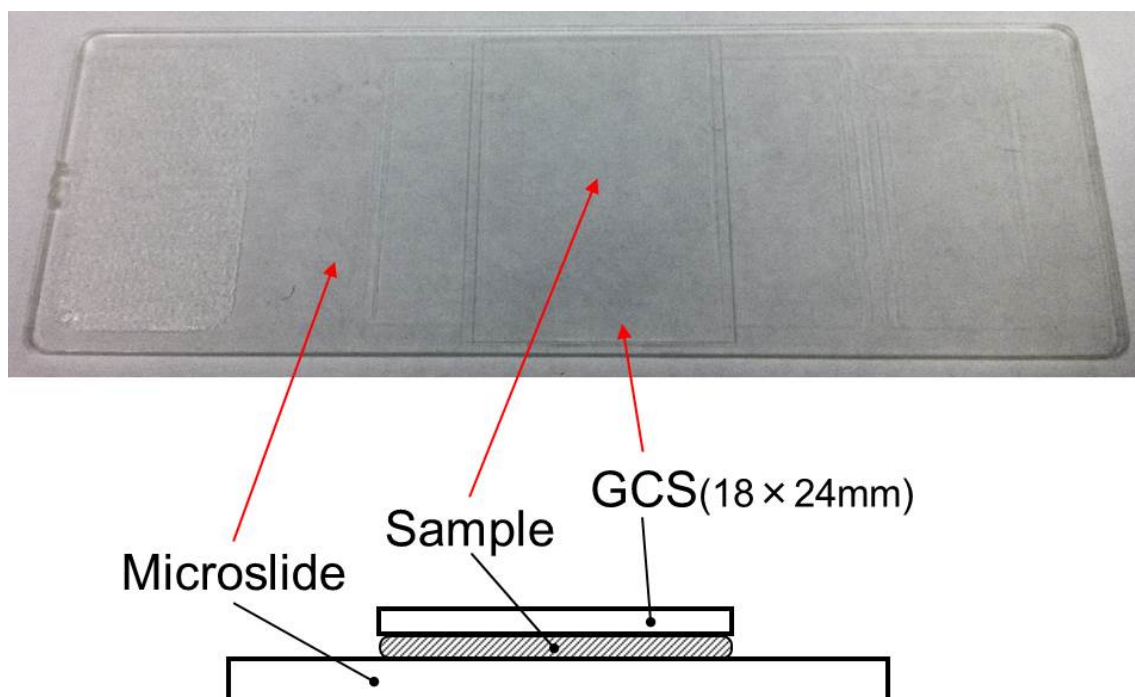


Fig. 3.8 Outlook and schematic of sample for freezing and thawing on DSS

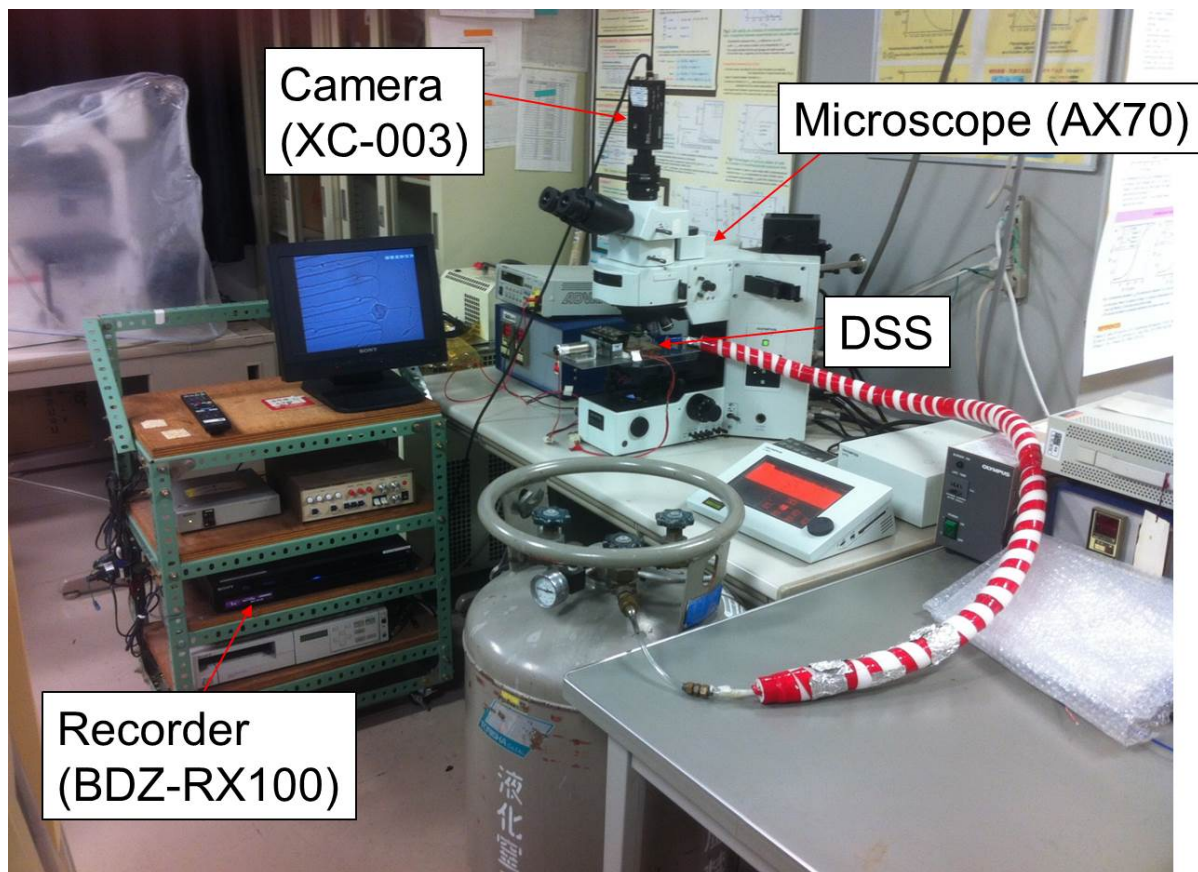


Fig. 3.9 Outlook of system for freezing and thawing on DSS

ているため、最低到達温度が低い条件では、温度こう配が大きく、従って、冷却速度が高い傾向がある。

凍結・融解後には、「3.4.2」項で詳しく述べるように、細胞の形態変化として、神経突起の数珠状化と短小化が起こった。その形態変化の定量化として、1) 数珠状部の太さ、2) 数珠状化した突起長さ 100 μm 当たりの数珠の個数 (数密度)、3) 神経突起の長さを計測した。また、1)と 2)に関しては、数珠状化が生じない突起は測定対象から除外した。

凍結・融解後の細胞の生死判別には、細胞膜の色素 (PI) 排斥能に基づいた評価を行い、細胞の生存率を求めた。すなわち、PI は、正常な細胞膜の場合には透過せず細胞は染色されないため、細胞は無蛍光であるのに対して、細胞膜が損傷しその色素排斥能が失われた場合には透過し細胞内に侵入して DNA を蛍光染色するため、細胞は蛍光 (赤色) を発する。従って、前者の細胞は生細胞と、後者の細胞は死細胞と判断された。

3.3.3.2 一様温度分布ステージを用いる場合

分化型 PC12 細胞が付着した PCS をディッシュから取り出し、パラフィルム上に設置し、PI を 2 μM 添加した生理食塩水を用い、洗浄 (生理食塩水 100 μl を加え、約 1 分間放置し、除去) を 2 度行った。その後、PCS を傾斜させ、残留水溶液を除去した後、PS を約 5 μl 加え細胞と生理食塩水から成る試料 (約 10 μl) が付着した PCS の上面と下面を GCS (厚さ 120~170 μm , ϕ 18, ホウケイ酸ガラス, 松浪硝子工業社製, 日本) で覆い、周りを 3 重の両面テープ (厚さ約 80 μm , ニチバン社製, 日本) で封鎖した (試料厚さ約 60 μm) (Fig. 3.10)。試料は、正立顕微鏡 (BX50, OLYMPUS 社製, 日本) に装着した一様温度分布ステージにより、 $H=1.0\sim61.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で、 $T_L=-3.8^{\circ}, -5.6, -11.2^{\circ}\text{C}$ まで冷却され、そこで 10 分間滞在後、 $W\sim30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で、 20°C まで加温された。凍結・融解過程の挙動は、CCD カメラ (JHT-0060, ジャパンハイテック社製, 日本) とビデオキャプチャ (GV-MVP/TZ, アイ・オー・データ機器社製, 日本) により撮影・記録し、融解終了後 5~20 分の間に、 20°C で、正立顕微鏡 (BX50) と CCD カメラ (DS-Fi1, Nikon 社製, 日本) を用い、微分干渉画像と蛍光画像を撮影した (Fig. 3.11)。なお、凍結前にも等しいスポットで同様の撮影を行い、凍結前と凍結・融解後の同一の細胞の比較を可能にした。細胞の生死判別法は、方向性凝固ステージを用いる場合と同様である。

3.3.4 浸透圧ストレスによる細胞の形態変化の観察

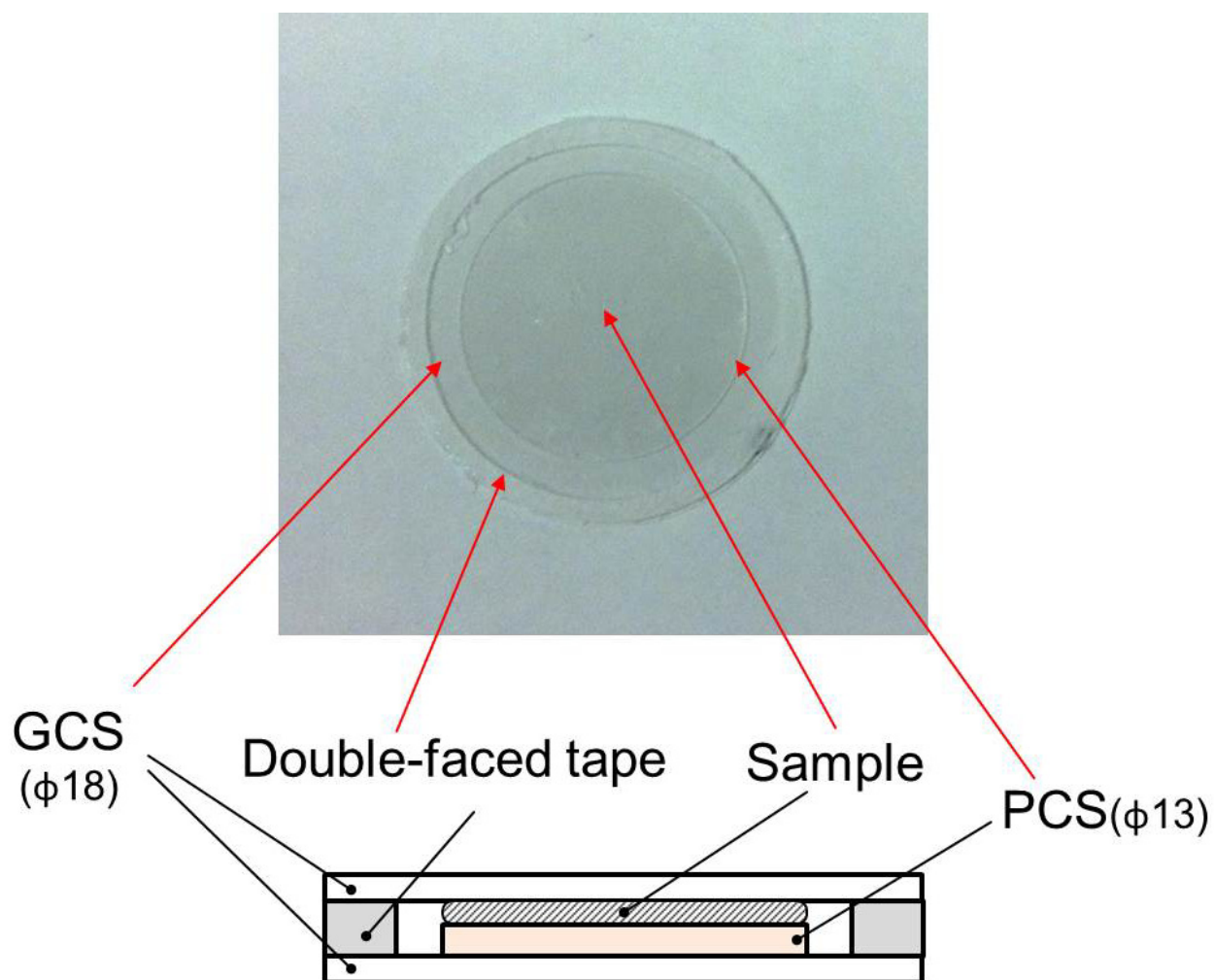


Fig. 3.10 Outlook of sample for freezing and thawing on UTDS

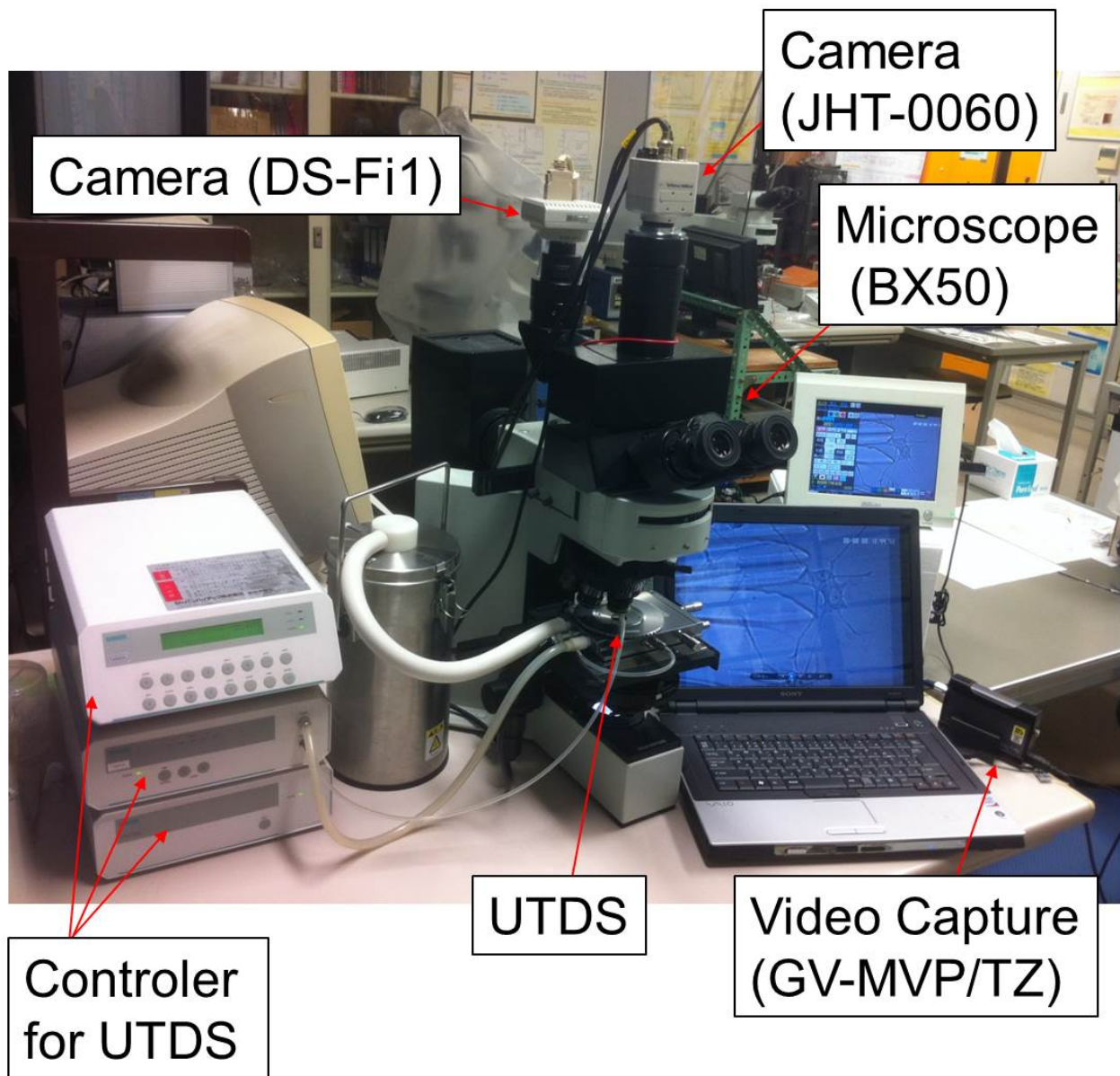


Fig. 3.11 Outlook of system for freezing and thawing on UTDS

凍結・融解後の形態変化に対する浸透圧ストレスの影響を調べるため、NaCl 濃度に起因する浸透圧ストレス（等張→高張→等張）に注目し、その影響を調べる。CS 上の分化型 PC12 細胞に対して、「3.3.2」項と同様の手順で培地を生理食塩水に交換した。次いで、0.1～2.0M 食塩水を適宜滴下・混合し、細胞回りの NaCl 濃度を段階的に変化させた。まず、生理食塩水の等張状態から、NaCl 濃度が約 1M の高張状態に変化させ、高張状態に約 10 分～13 分程維持した後、比較的緩速に等張状態へ戻した。この間、倒立顕微鏡 (DMIRB)、CCD カメラ (JHT-0060)、ビデオキャプチャー (GV-MVP/TZ) を用いて細胞の形態変化を時系列で観察・記録した。

3.3.5 免疫細胞化学染色による細胞骨格の観察

凍結・融解や浸透圧ストレスによる細胞骨格の変化を調べるため、その一種である中間径フィラメントを形成する主要なタンパク質の Neurofilament L に対する免疫細胞化学染色を行った。

前者の検討のための試料作製について、分化型 PC12 細胞が付着した PCS をディッシュから取り出し、生理食塩水を用いて洗浄を 2 度行い、残留水溶液を除去した後、PS を約 5 μ l 加え、細胞と生理食塩水から成る試料（約 10 μ l）が付着した PCS の上面を GCS（厚さ 120～170 μ m, ϕ 15, ホウケイ酸ガラス, 松浪硝子工業社製, 日本）で、下面を GCS (ϕ 18) で覆った（試料厚さ約 60 μ m）(Fig. 3.12)。試料は、一様温度分布ステージを用い、典型的な形態変化が十分に生じる代表的な条件として、冷却速度 $H = 5.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で、最低到達温度 $T_L = -2.0^{\circ}\text{C}$ まで冷却され、そこで 10 分間滞在後、 $W \sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で加温された。

後者の検討のための試料作製については、「3.3.4」項の通りである。

凍結・融解後、または、NaCl による濃縮・希釈（等張→高張→等張）後約 10 分の試料とコントロール（未凍結かつ等張状態）の試料に対して免疫細胞化学染色を行った。免疫細胞化学染色の手順は、基本的に文献^(3,19)を参考にし、以下に概要を述べる。4w/v% パラホルムアルデヒド（ナカライテスク社製）を添加したリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（Life Technologies 社製, アメリカ）に室温で 15 分間浸漬し、固定した。PBS で洗浄し、2w/v% スkimミルク（BD 社製, アメリカ）を添加した PBS に 1 時間浸漬した後、一次抗体液（AB9568, Rabbit anti-Neurofilament L, Merck Millipore 社製, ドイツ）を PBS で 1/200 に希釈した溶液に浸漬し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間、抗原抗体反応させた。PBS で洗浄後、緑色蛍光色素（Alexa Fluor 488, 最大励起光波長 496nm, 最大蛍光波長 519nm）を結合した二次抗体液（A11008, 2.0mg/ml, Goat anti rabbit IgG conjugated Alexa Fluor 488,

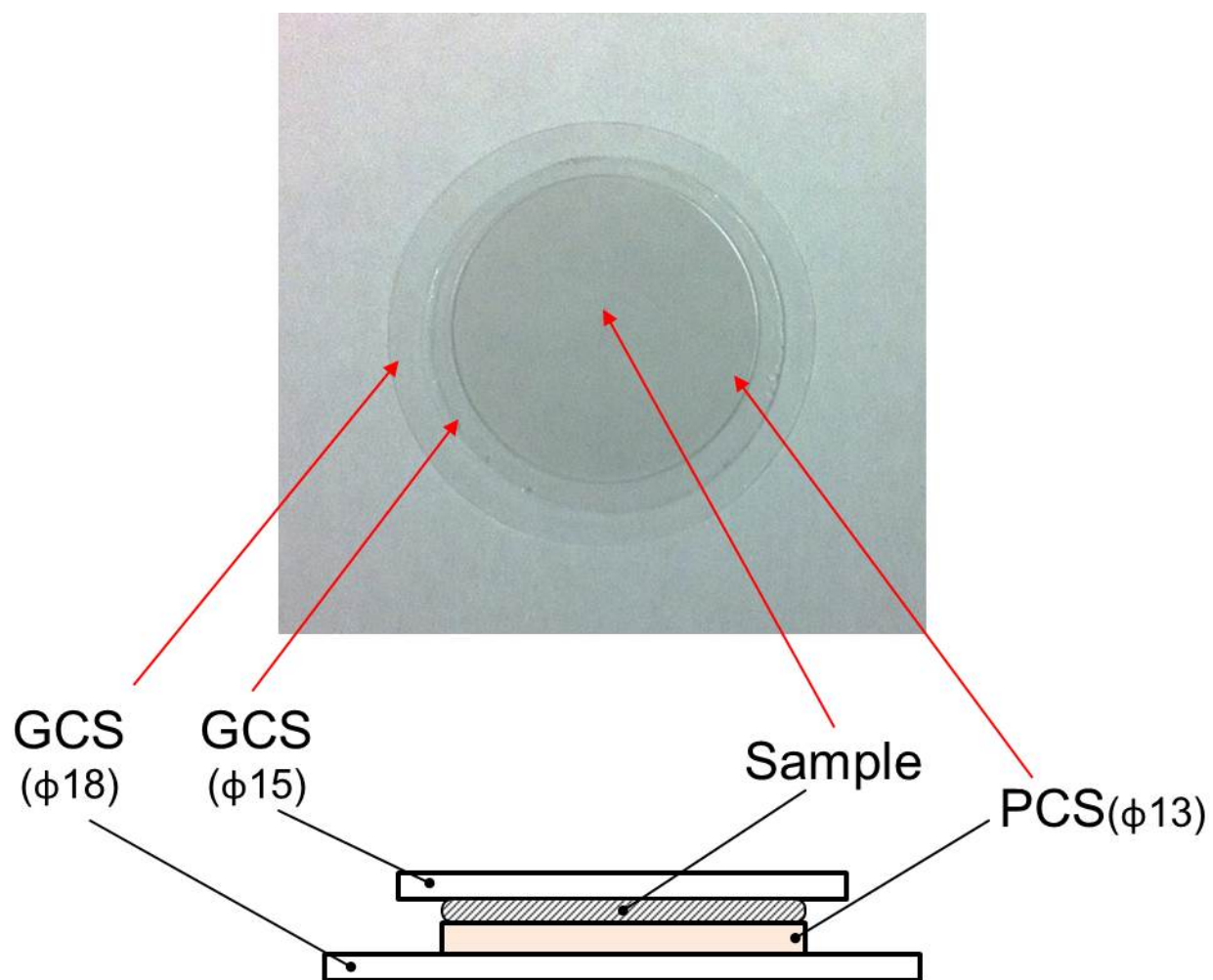


Fig. 3.12 Outlook of sample for freezing and thawing on UTDS

Life Technologies 社製, アメリカ) を PBS で $3.3 \mu\text{g/ml}$ に調整した溶液に浸漬し, 室温で 2 時間, 抗原抗体反応させた. PBS で洗浄後, 正立顕微鏡 (BX50) と CCD カメラ (DS-Fi1) により位相差画像, および, 蛍光画像を撮影した.

3.3.6 統計的解析

「3.3.3」項で述べた, 形態変化の定量的検討と生存率の測定では, 1 条件当たりの繰り返し回数を 3~7 回とした. 方向性凝固ステージを用いた実験では, 実験 1 回当たり, 測定試料中の 3 スポット (1 スポットの面積は 0.30mm^2) を対象とした. 一様温度分布ステージを用いた実験では, 実験 1 回当たり, 測定試料中の 5 スポット (1 スポットの面積は 0.14mm^2) を対象とした. 結果は, 平均値 \pm 標準誤差で表記し, 平均値間の有意差の判定は, t 検定によって行った.

3.4 実験結果

3.4.1 凍結挙動

生理食塩水中の分化型 PC12 細胞の方向性凝固過程における凍結挙動の代表例を、冷却速度に対して Figs. 3.13~3.16 に示す。各冷却条件での観察の温度領域は、未凍結状態から低温側は概ね $-20 \sim -25^{\circ}\text{C}$ に及ぶ。実験試料である分化型 PC12 細胞の形態は、各図の凍結前の状態である a に示すように、基質に付着した状態で細胞の中心部である細胞体から細長い神経突起が伸びる構造を持つ。

3.4.1.1 細胞内凍結を伴わない場合

本実験で冷却速度が最も低い $H = 5.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Fig. 3.13) の場合、凍結様式は、細胞外のみ氷結晶が発生・成長する典型的な細胞外凍結となった。Figs. 3.13a と 3.13b で凍結領域の先端 (Figs. 3.13a と 3.13b の画像下の太い矢印) が未だ及ばない未凍結状態では、細胞全体の形態が明瞭であるが、Fig. 3.13b で細胞が凍結領域に取り込まれ、さらに、Figs. 3.13c, 3.13d, 3.13e, 3.13f へと温度が低下するに従って、細胞体は、脱水、収縮、変形した。凍結過程における神経突起の脱水・収縮は元々の細さのために明瞭ではないが、氷結晶との相互作用による湾曲などの変形 (Figs. 3.13b~3.13f に、例を楕円で示す) が認められた。Fig. 3.13f では、細胞の形態は、細胞体と神経突起を問わず不明瞭になった。

3.4.1.2 細胞内凍結を伴う場合

Fig. 3.13 の場合より冷却速度が高い $H = 33.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Fig. 3.14), $68.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Fig. 3.15), $92.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Fig. 3.16) の場合、凍結過程で、細胞外凍結に加え、細胞内に氷結晶が発生・成長する細胞内凍結を伴い、冷却速度の増加に対しその発生頻度が増加した。凍結前の状態である Figs. 3.14a, 3.15a, 3.16a では、細胞の形態は明瞭であり、細胞外における凍結の進行と共に、Fig. 3.13 の場合と同様に細胞はある程度、脱水・収縮するが、その後、細胞内凍結により、細胞内部が突如として暗く変化 (暗化) した。

例えば、Fig. 3.14 中、矩形で示す 2 個の隣接した細胞が、Figs. 3.14d ($\Delta T = -9.58^{\circ}\text{C}$) (下側の細胞) と 3.14h ($\Delta T = -14.28^{\circ}\text{C}$) (上側の細胞) で各々 1 個ずつ、細胞内凍結を起こした (細胞内凍結の瞬間を示す)。これに対して、同画像中の他の細胞は、Fig. 3.14h までの段階では、細胞内凍結を伴わず、細胞外凍結により、ある程度、脱水・収縮が進行しつつ、過冷却を保持していると考えられる。Fig. 3.14 の場合に比べ冷却速度が約 2 倍である Fig. 3.15 では、画像内の 2 個の細

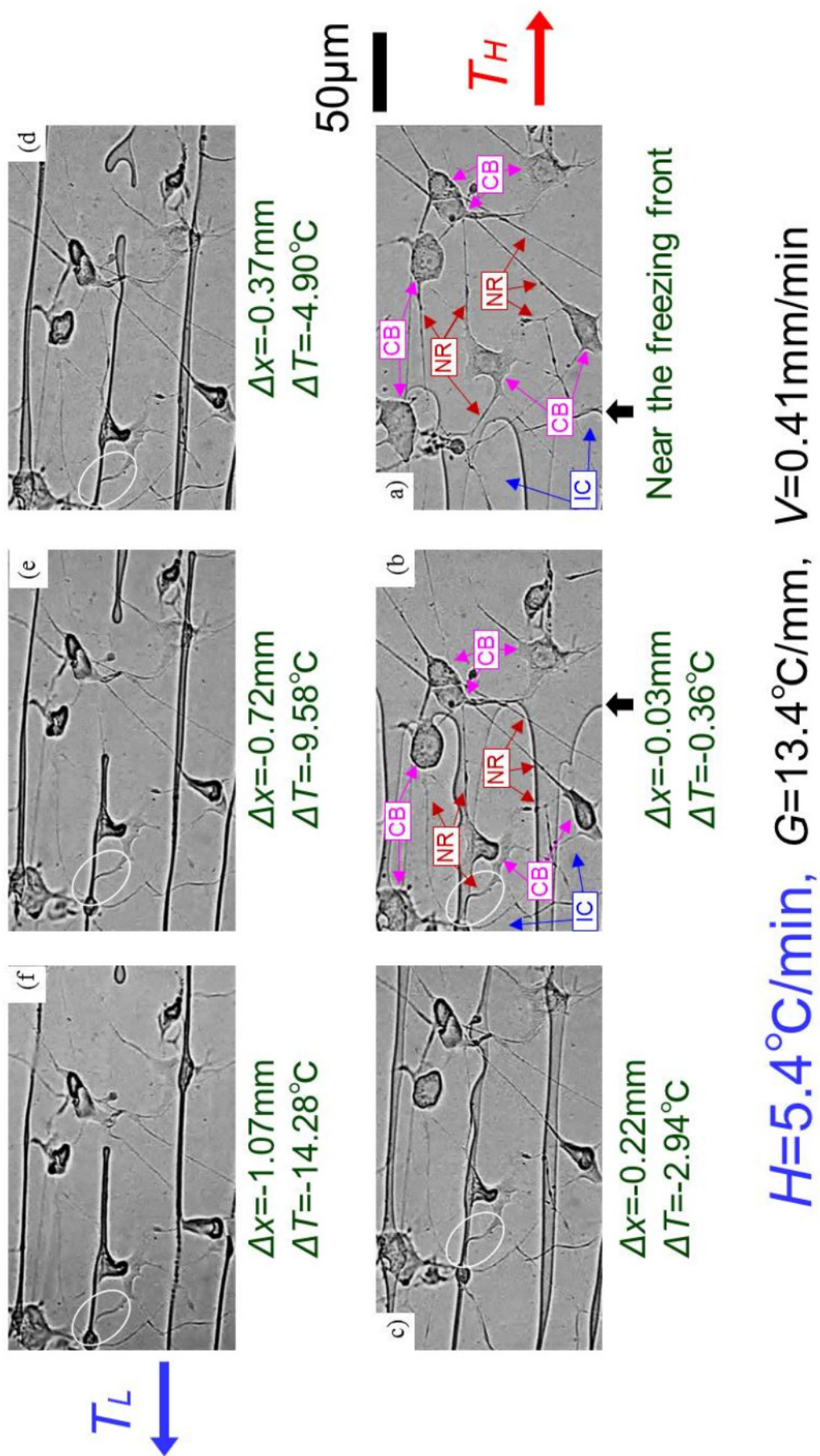


Fig. 3.13 Freezing behavior of cells with physiological saline (1)

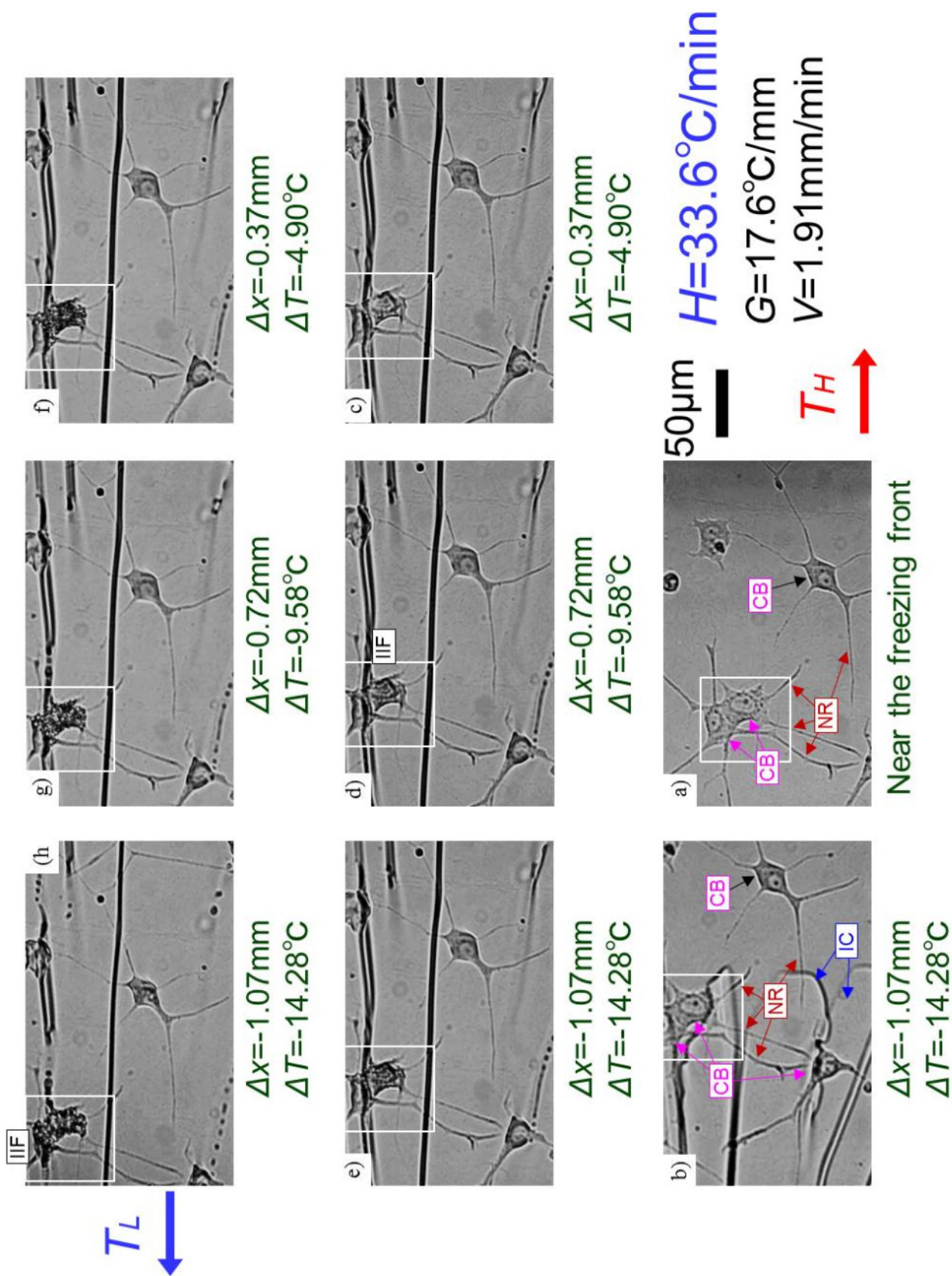


Fig. 3.14 Freezing behavior of cells with physiological saline (2)

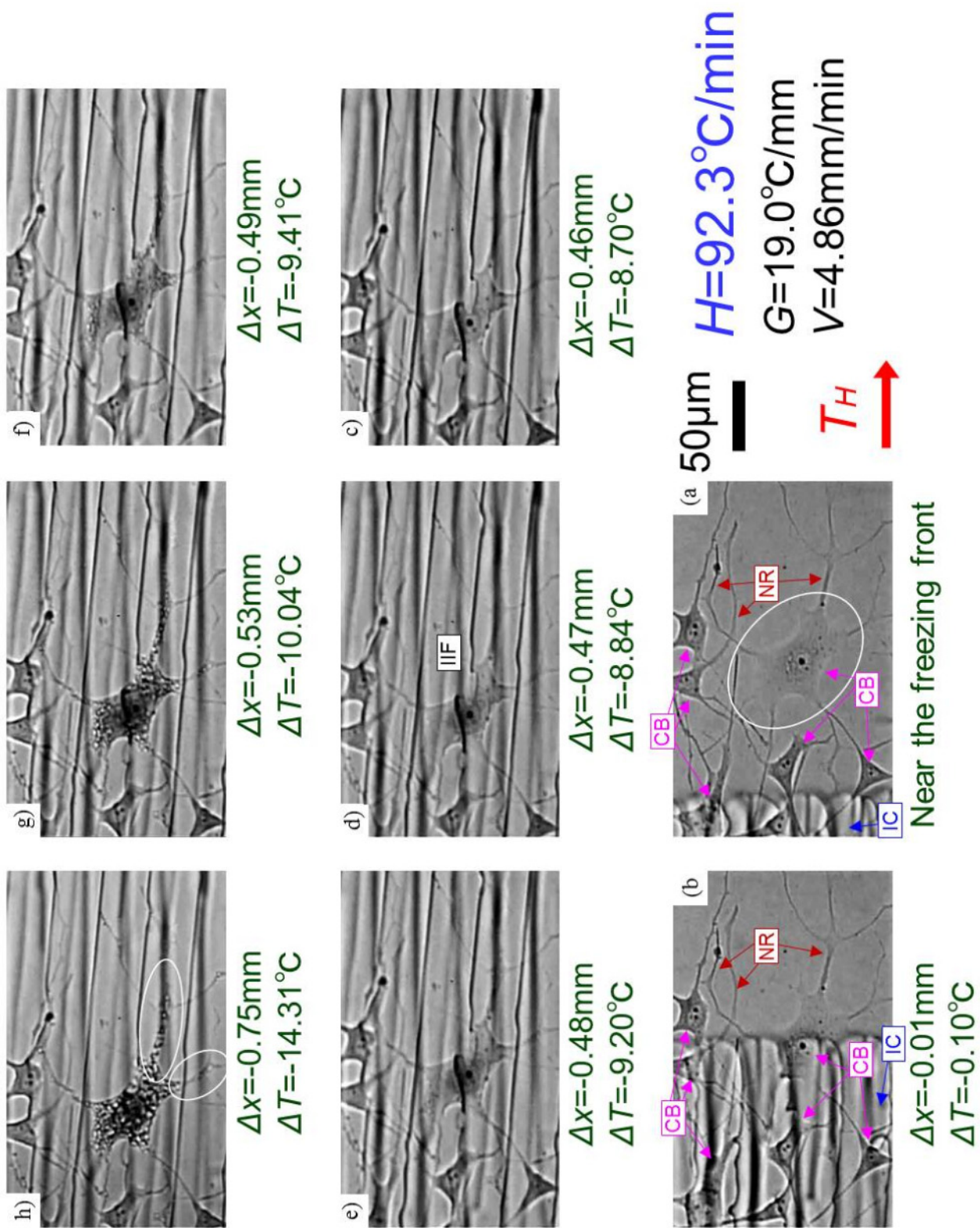


Fig. 3.16 Freezing behavior of cells with physiological saline (4)

20μm

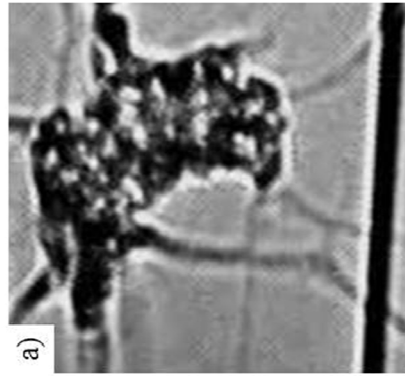


Fig. 3.14h

$H=33.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$

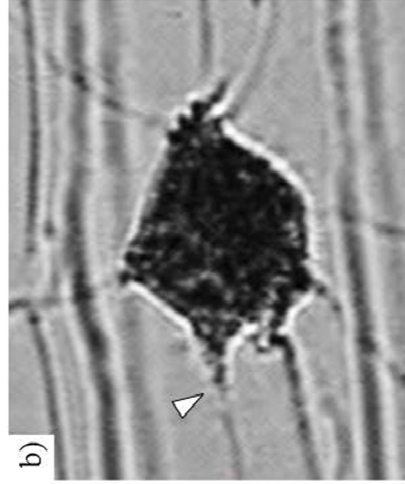


Fig. 3.15i

left rectangle

$H=68.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$

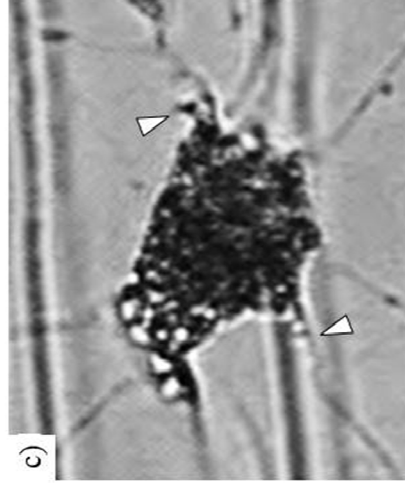


Fig. 3.15i

right rectangle

$H=68.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Fig. 3.17 Comparison of cells with intracellular ice crystals

胞は共に、細胞内凍結を起こした（右の細胞は Fig. 3.15d ($\Delta T = -16.21^\circ\text{C}$), 左の細胞は Fig. 3.15g ($\Delta T = -21.49^\circ\text{C}$) で各々1 個ずつ). さらに、冷却速度の高い Fig. 3.16 では、Fig. 3.16a 中に楕円で示す細胞は、Fig. 3.16d ($\Delta T = -8.84^\circ\text{C}$) で細胞内凍結を起こし（暗化の発生）、そこから Figs. 3.16e (0.10 秒後), 3.16f (0.32 秒後), 3.16g (0.80 秒後), 3.16h (3.66 秒後) へと時間経過に伴い、細胞内を暗化が伝播すると共に、粒状の氷結晶が明瞭化した。Fig. 3.16h 中、それ以外の細胞は、まだ細胞内凍結を伴わず、ある程度、脱水・収縮し、過冷却を保持していると考えられる。

細胞内凍結挙動の冷却速度依存性も明確に示された。すなわち、Fig. 3.14 で示した細胞内凍結では、細胞内の氷結晶は、細胞体内に留まっており、突起部には及ばなかった(Fig. 3.14h 中の矩形部分の拡大を Fig. 3.17a に示す)。これに対して、冷却速度がより高い Fig. 3.15 では、細胞内氷結晶は、細胞体内だけでなく神経突起の根元部分まで及び (Fig. 3.15i 中の矩形部分の拡大である Figs. 3.17b と 3.17c 中、氷結晶の到達点を矢頭で示す)、さらに冷却速度の高い Fig. 3.16 では、神経突起の根元から先の方へかなり離れた位置まで氷結晶が及んだ (Fig. 3.16h 中、楕円で示す)。

3.4.2 凍結・融解後の細胞の形態変化

凍結・融解後の細胞の位相差画像と PI 染色による蛍光画像の代表例を、凍結前の位相差画像と共に、Figs. 3.18 と 3.19 に示す。神経突起は明瞭な形態変化を示し、その変化は、次の二つの特徴的な変化に大別された。すなわち、1) 神経突起の途中で数珠のような膨らみを形成する（数珠状化）、および、2) 神経突起が短くなり、場合によってはその端部が数珠状化する（短小化）である。例えば、前者の形態変化に関しては、Figs. 3.18c と 3.19c 中の矢頭で示す凍結前の突起の位置に、各々 Figs. 3.18d と 3.19d で数珠状部が形成された。後者の形態変化に関しては、Figs. 3.18a と 3.19a 中の矢印で示す凍結前の突起に対して、各々 Figs. 3.18b と 3.19b で短小化が発生した。数珠状化が生じる突起の割合（65~71 突起中）は、 $T_L = -0.8^\circ\text{C}$ で約 70% 程度、その他の条件では 95% 以上であり、短小化する突起の割合（18~25 突起中）は、 $T_L = -0.8^\circ\text{C}$ で全突起の約 65% 程度、その他の条件では 80% 以上となった。細胞体に関しては、凍結・融解後、細胞の輪郭が若干不明瞭になる傾向を示した。

Fig. 3.18b' では、赤く染色された細胞はなく（小さい赤く染まっているものは、元々培養中に存在していた死細胞の残骸やゴミなどである）、全て生細胞であったのに対し、最低到達温度がより低い Fig. 3.19 では死細胞が増加した。これら

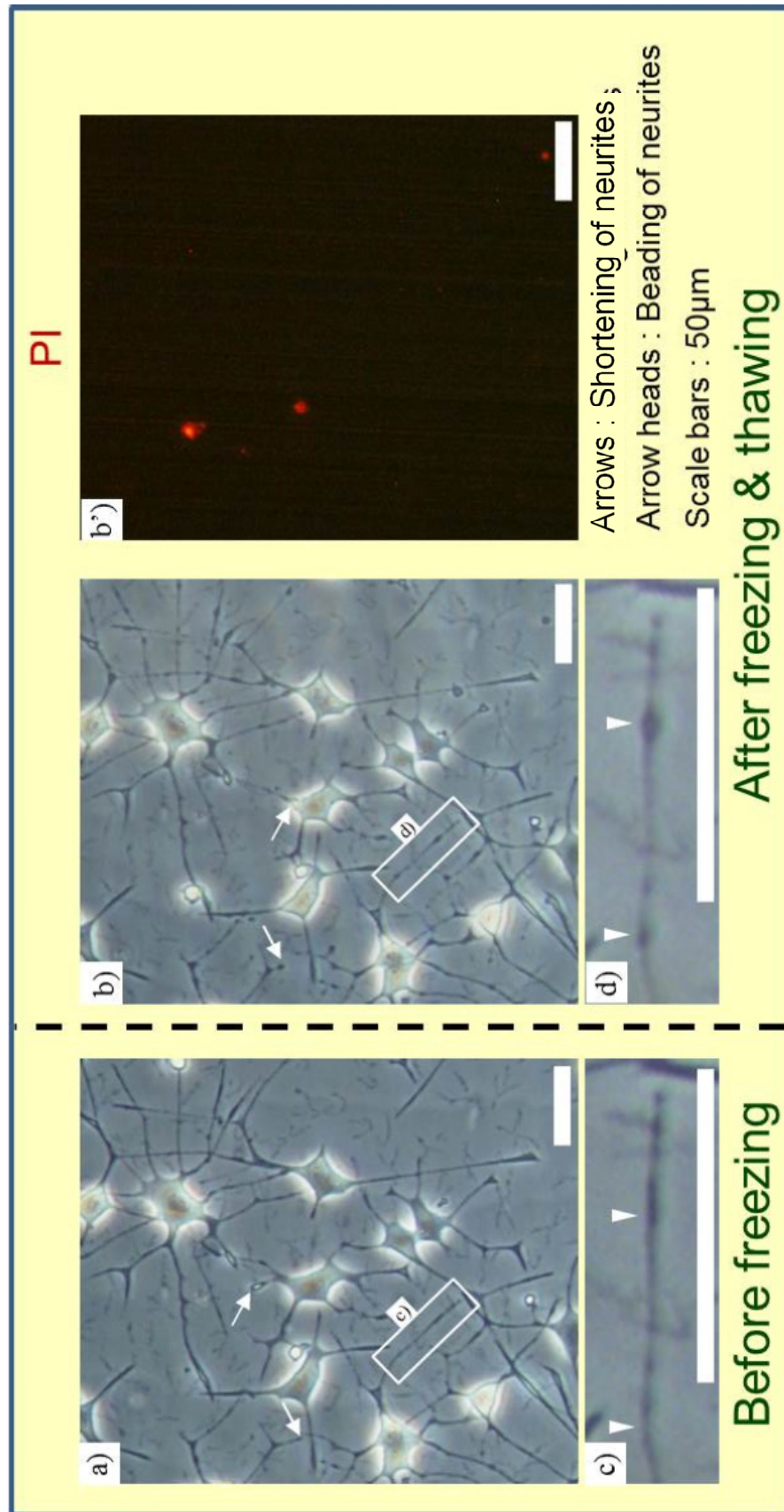
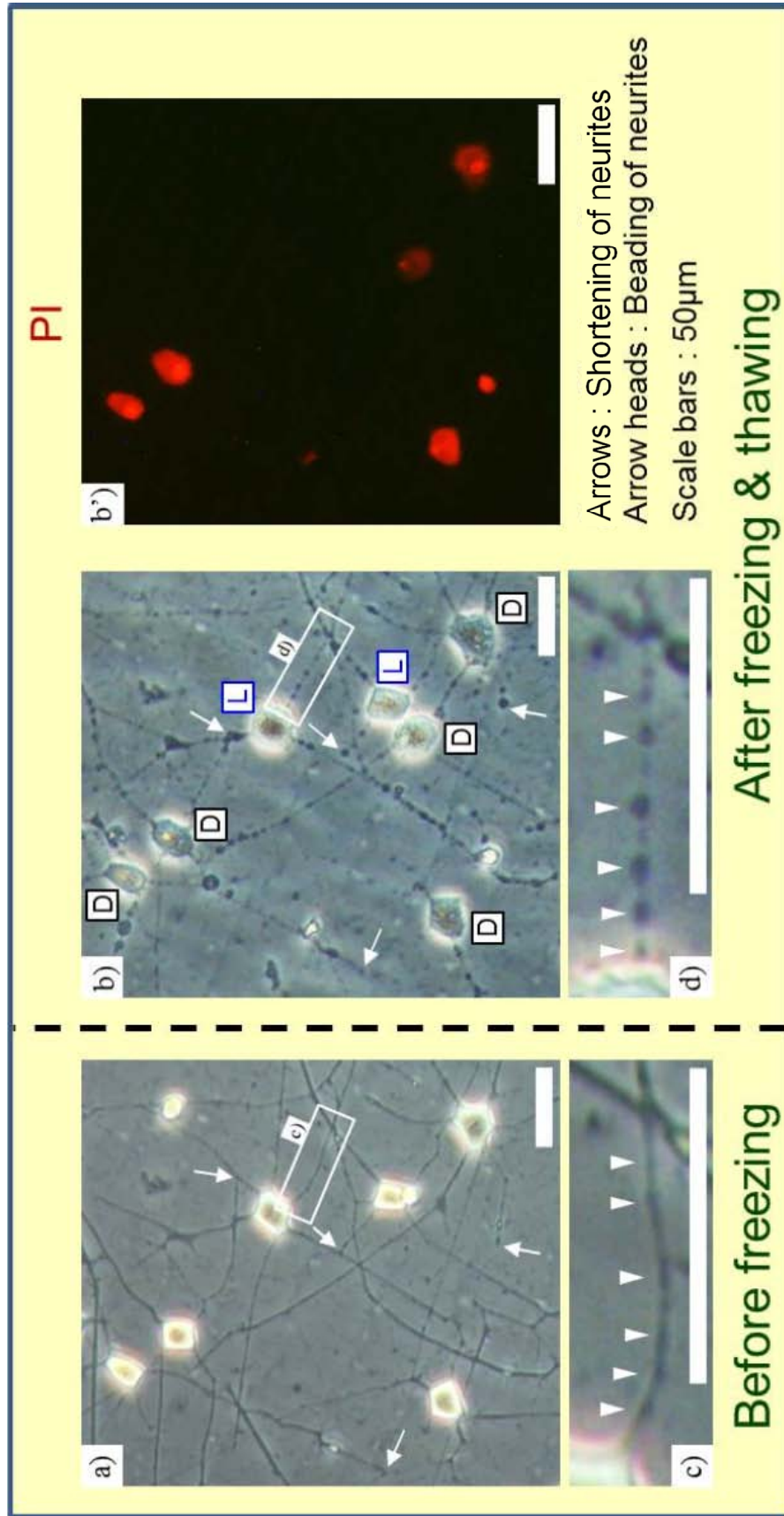


Fig. 3.18 Comparison in cell morphology between before freezing and after freezing and thawing, and life and death of post-thaw cells (1)



$H=6.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_L=-8.3^{\circ}\text{C}$, $W\sim 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Fig. 3.19 Comparison in cell morphology between before freezing and after freezing and thawing, and life and death of post-thaw cells (2)

の形態変化は、生細胞においては生じない場合もあるが、死細胞では常に発生した。

次に、これらの形態変化が生じるタイミングを調べるため、凍結・融解過程 ($H=1.0\sim 61.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_L = -3.8^{\circ}, -5.6, -11.2^{\circ}\text{C}$) において定点を時系列に観察した。代表的な例として、 $H=1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_L = -5.6^{\circ}\text{C}$ の場合の結果を Figs. 3.20~3.22 に示す。凍結前の Fig. 3.20a に矩形で示す突起は、最低到達温度滞在中の Fig. 3.20b ではほとんど変化がなかったが、まだ氷が残存する融解過程である Fig. 3.20c では既に矢頭で示す数珠状化が生じ始めていた。これに対して、同じ細胞の別の突起に注目した Fig. 3.21 では、凍結前の Fig. 3.21a の状態に対して、凍結・融解過程で (Figs. 3.21b~3.21d) 数珠状化はほとんど生じず、融解後から生じ始めた (Fig. 3.21e に例を矢頭で示す)。短小化は、凍結・融解過程で (Figs. 3.22b~3.22d) ほとんど生じず、融解後から生じ始めた (Fig. 3.22e に例を矢印で示す)。本実験条件の範囲では、形態変化は、基本的に、融解過程または融解後から生じ始め、凍結過程では生じなかった。

細胞内凍結と細胞外凍結が共に生じる条件である $T_L = -11.2^{\circ}\text{C}$, $H=61.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ において、定点を時系列に観察し、それぞれの凍結様式を経た細胞ごとに、融解後の形態変化を調べた結果を Fig. 3.23 に示す。Fig. 3.23 に黒丸で示す2つの細胞は、最低到達温度滞在中に細胞内凍結（暗化）し (Fig. 3.23b)、神経突起の根元付近まで氷が及んだ (Fig. 3.23b に矢頭で示す) のに対し、白丸で示す2つの細胞は凍結・融解過程を通して暗化は見られなかった。凍結・融解後、数珠状化と短小化は、いずれの凍結様式を経た細胞においても観察された。例えば、細胞内凍結した細胞の突起は、Fig. 3.23f に黒矢頭で示す数珠状化が生じ、Fig. 3.23c に黒矢印で示す短小化が生じた。また、細胞外凍結のみの細胞の突起は、Fig. 3.23g に白矢頭で示す数珠状化が生じ、Fig. 3.23c に白矢印で示す短小化が生じた。

さらに、凍結・融解後、細胞を培養環境に戻した場合、神経突起の形態変化がどのように変化するか調べるため、細胞を培養液中で凍結・融解後 ($T_L = -5.6^{\circ}\text{C}$, $H = 4.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$)、 37°C で培養し、時系列で観察した結果を Figs. 3.24 と 3.25 に示す。Fig. 3.24 の細胞では、凍結前の Fig. 3.24a の矢頭で示す突起の位置に、Fig. 3.24c で数珠が生じたが、Fig. 3.24d で数珠が消え、その後1時間程度観察しても、変化は見られなかった。これに対し、Fig. 3.25 の細胞では、Fig. 3.25a に矢頭で示す突起の位置に、Fig. 3.25c で数珠が生じたが、Fig. 3.25e で突起が根元からちぎれ、分離した。

$T=20.0^{\circ}\text{C}$;

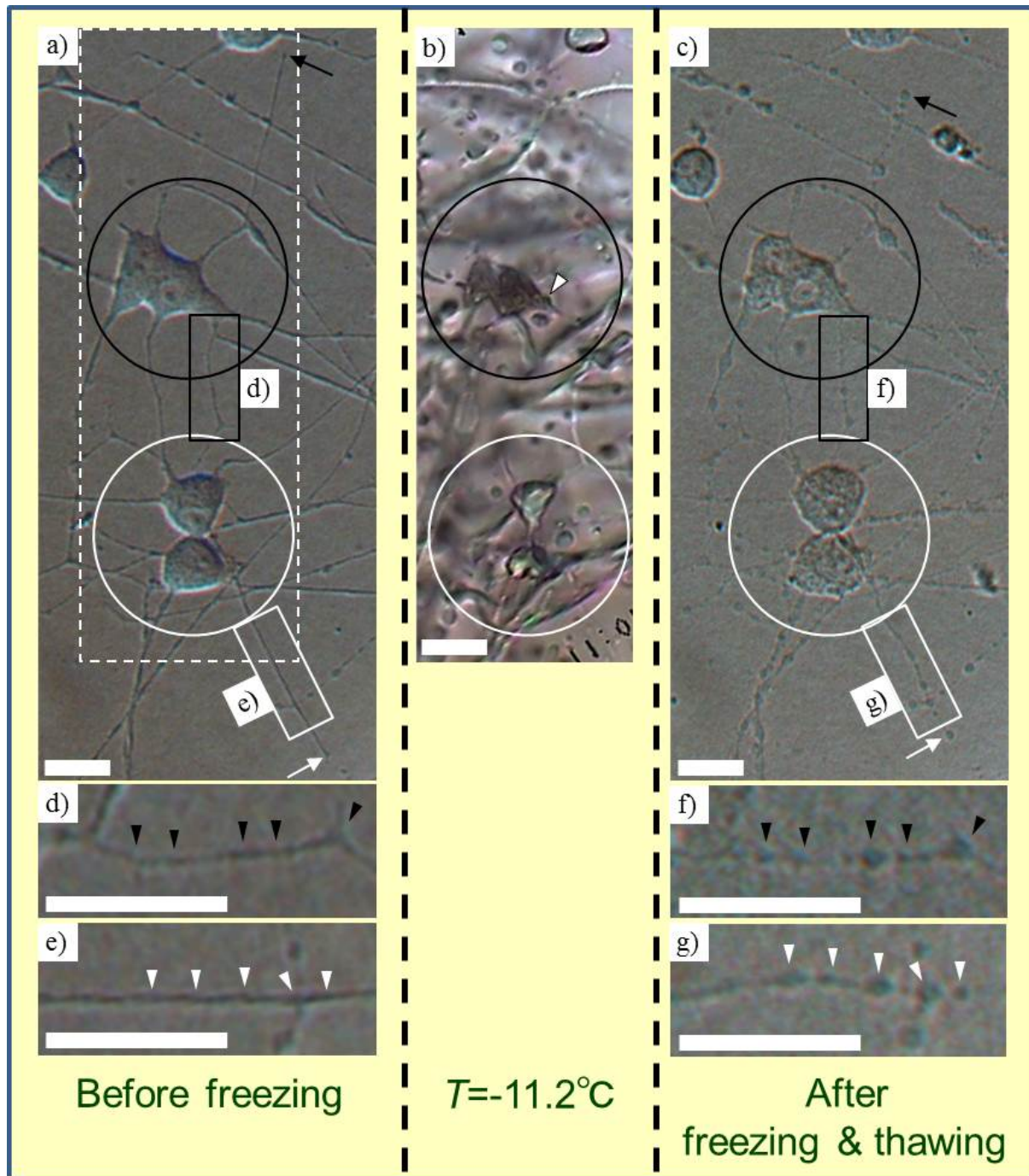
Fig. 3.20 Time-series change in cell morphology during and after freezing and thawing (1)

$T=20.0^{\circ}\text{C}$

Fig. 3.21 Time-series change in cell morphology during and after freezing and thawing (2)

$T=20.0^{\circ}\text{C}$

Fig. 3.22 Time-series change in cell morphology during and after freezing and thawing (3)



$H = 61.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_L = -11.2^{\circ}\text{C}$, $W \sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Arrows : Shortening of neurites
 Arrow heads : Beading of neurites

Scale bars : $20\mu\text{m}$

Fig. 3.23 Comparison of post-thaw morphological changes between the cells through different freezing pattern

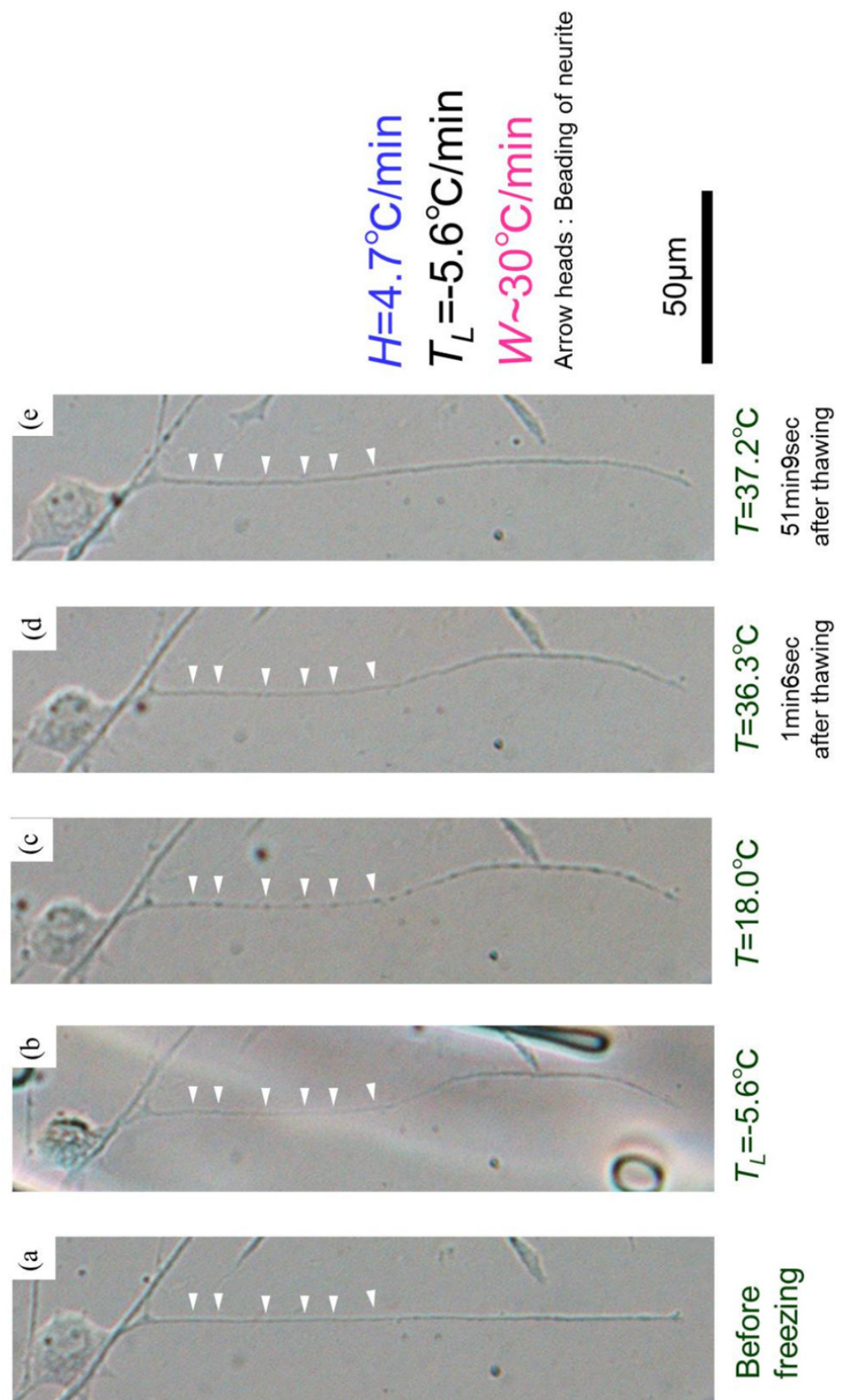


Fig. 3.24 Time-series change of morphology of post-thaw cells in medium at $\sim 37^{\circ}\text{C}$ (1)

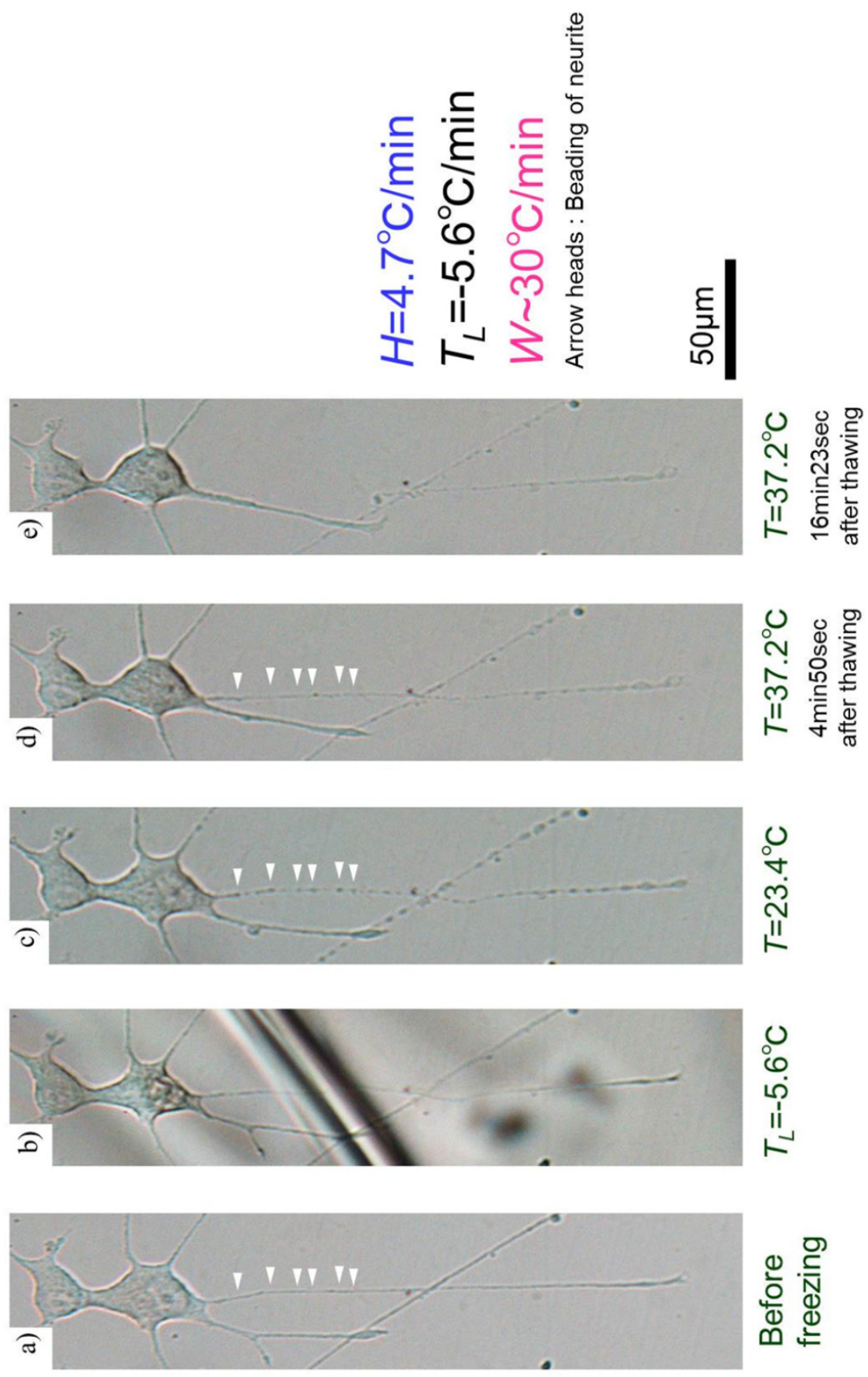


Fig. 3.25 Time-series change of morphology of post-thaw cells in medium at $\sim 37^{\circ}\text{C}$ (2)

形態変化の定量的検討として、凍結・融解前後の突起の太さや長さ、数珠の個数などを計測し、本実験条件の範囲で、以下の特性を得た。なお、数珠状部と数珠状部間の太さの比が、凍結前の値よりも大きくなった場合を数珠状化とみなした (Fig. 3.26 で $d_B/d_{NB} > d_2/d_1$)。

- 1) 凍結・融解後の突起の太さは、数珠状部では平均で約 40% 程度太くなり、隣り合う数珠状部の間では平均で約 5% 程度細くなった (Fig. 3.27)。この特性の明確な冷却速度依存性はなかった。
- 2) 神経突起長さ 100 μm 当たりの数珠状部の個数 (Fig. 3.28) は、 $T_L = -0.8^\circ\text{C}$ では平均で 6~7 個程度であるが、 T_L の低下に対して増加し、 $T_L = -3.8 \sim -11.2^\circ\text{C}$ では、平均で 8~10 個程度に増加した。この特性は、冷却速度にあまり依存しなかった。
- 3) 神経突起の凍結前の長さに対する凍結・融解後の長さの割合 (Fig. 3.29) は、 $T_L = -0.8^\circ\text{C}$ では平均で 95% 程度であるが、 $T_L = -3.8^\circ\text{C}$ では約 85%、それより低い冷却速度では約 80% 程度に減少した。この特性も冷却速度にあまり依存しなかった。

細胞の形態変化をより詳細に理解するため、中間径フィラメントを構成するタンパク質である Neurofilament L の分布を調べた。ほとんどの動物細胞は、共通する 3 種類の細胞骨格繊維によって、細胞の内部構造や機械的特性が支えられているが、その一つである中間径フィラメントは、一般的に細胞に機械的強度を与える役割を担う。Neurofilament L の免疫染色画像の代表例を、位相差画像と共に、未凍結状態 (コントロール) を Fig. 3.30 に、凍結・融解後の状態を Fig. 3.31 に示す。Neurofilament L は、未凍結状態では、神経突起の軸に沿って突起内にはほぼ一様に分布するのに対して、凍結・融解後、基本的に、数珠状部では緑色が濃く、数珠状部の間では緑色が薄かった。これは、同タンパク質も、当該形態変化に対応して、数珠状部では多く、数珠状部の間では少なく分布したことを示す。また、Fig. 3.31d' の矢印に示すように、数珠状部の内部で Neurofilament L が偏って分布し、湾曲している場合もあった。一方、細胞体内の Neurofilament L には、明瞭な変化が認められなかった。

3.4.3 浸透圧ストレスによる細胞の形態変化

「3.4.2」項で、神経突起に数珠状化や短小化などの特徴的な形態変化が生じることを明らかにした。その原因の一つとして、細胞外凍結における未凍結水溶液の濃縮による浸透圧ストレスが考えられる。そこで、凍結・融解後の形態変化に関して、当該過程における細胞に対する環境因子として、NaCl 濃度に起

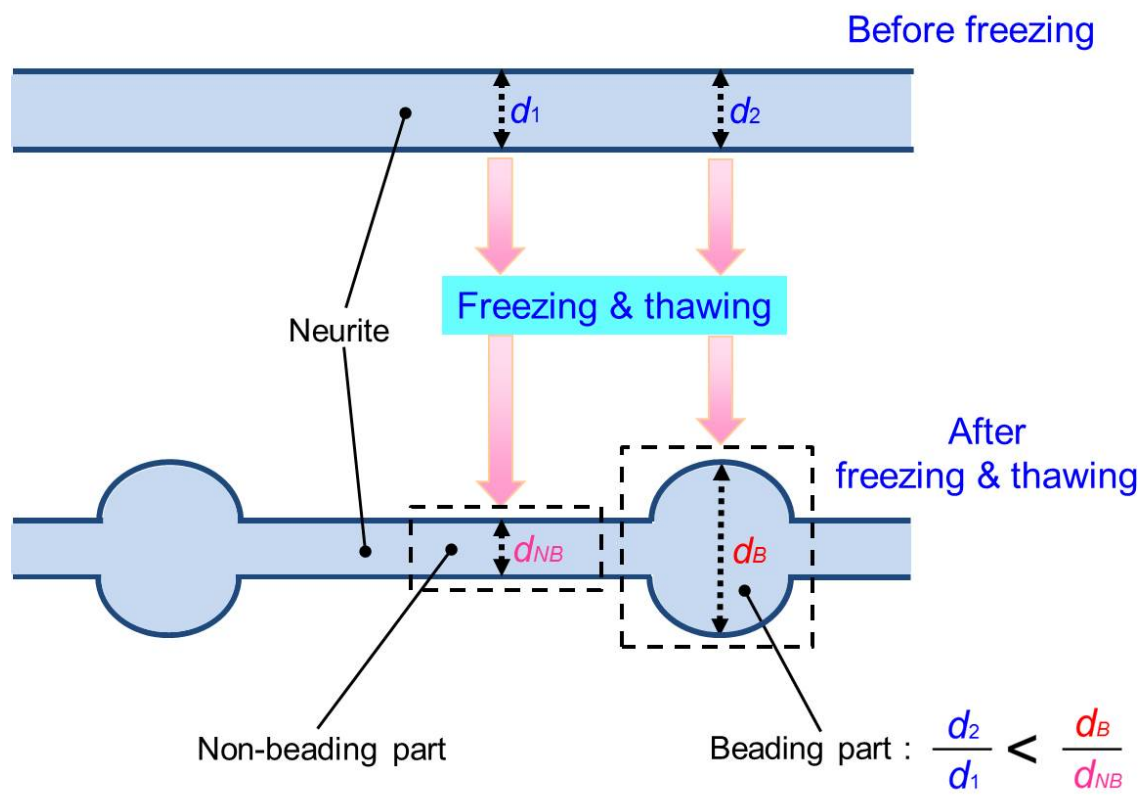


Fig. 3.26 Schematic of beading of neurite

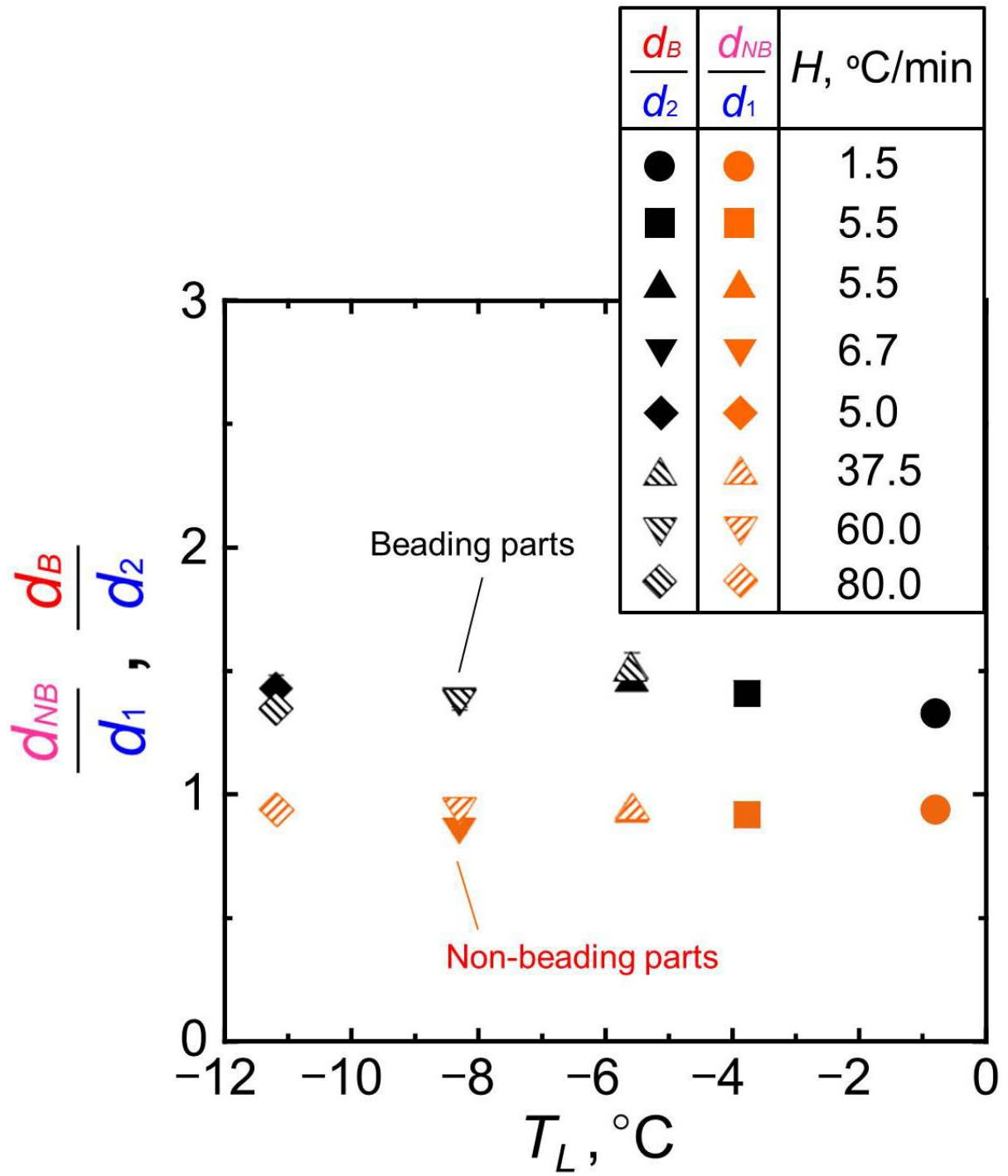


Fig. 3.27 Fraction of neurite width after freezing and thawing against before freezing as a function of T_L

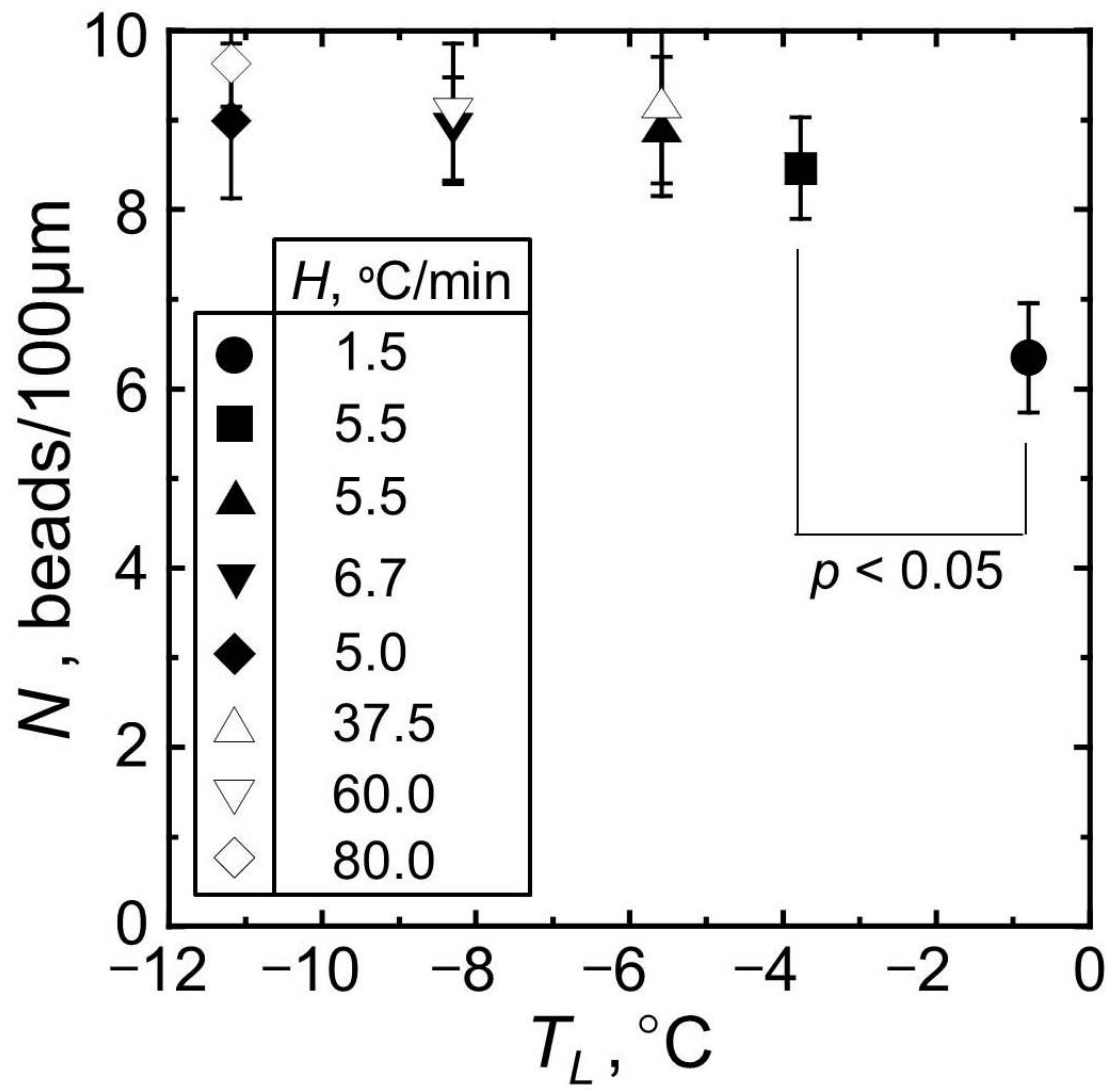


Fig. 3.28 Number of beads per 100 μm of the neurites (N) as a function of T_L

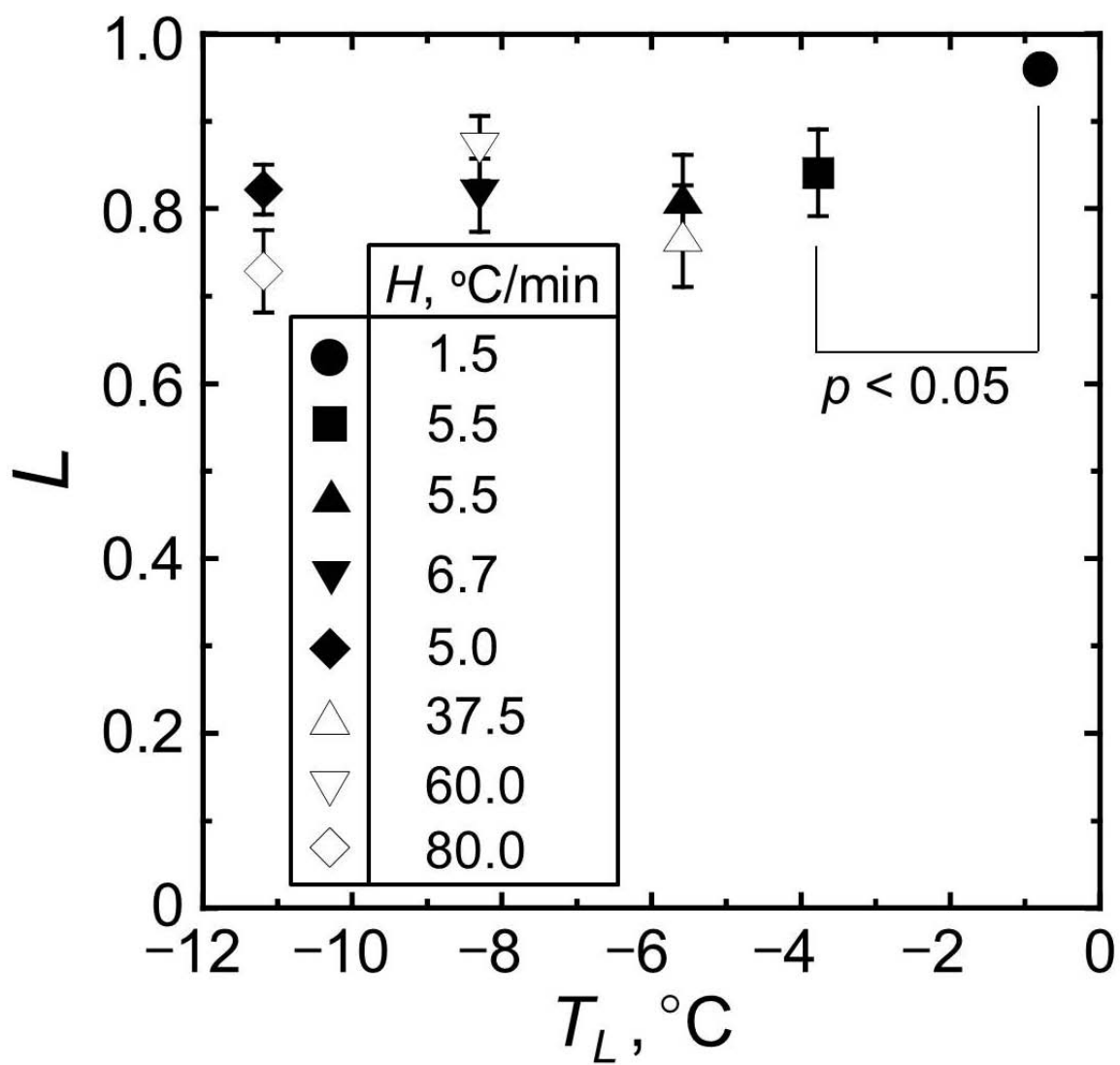


Fig. 3.29 Fraction of neurite length after freezing and thawing against before freezing (L) as a function of T_L

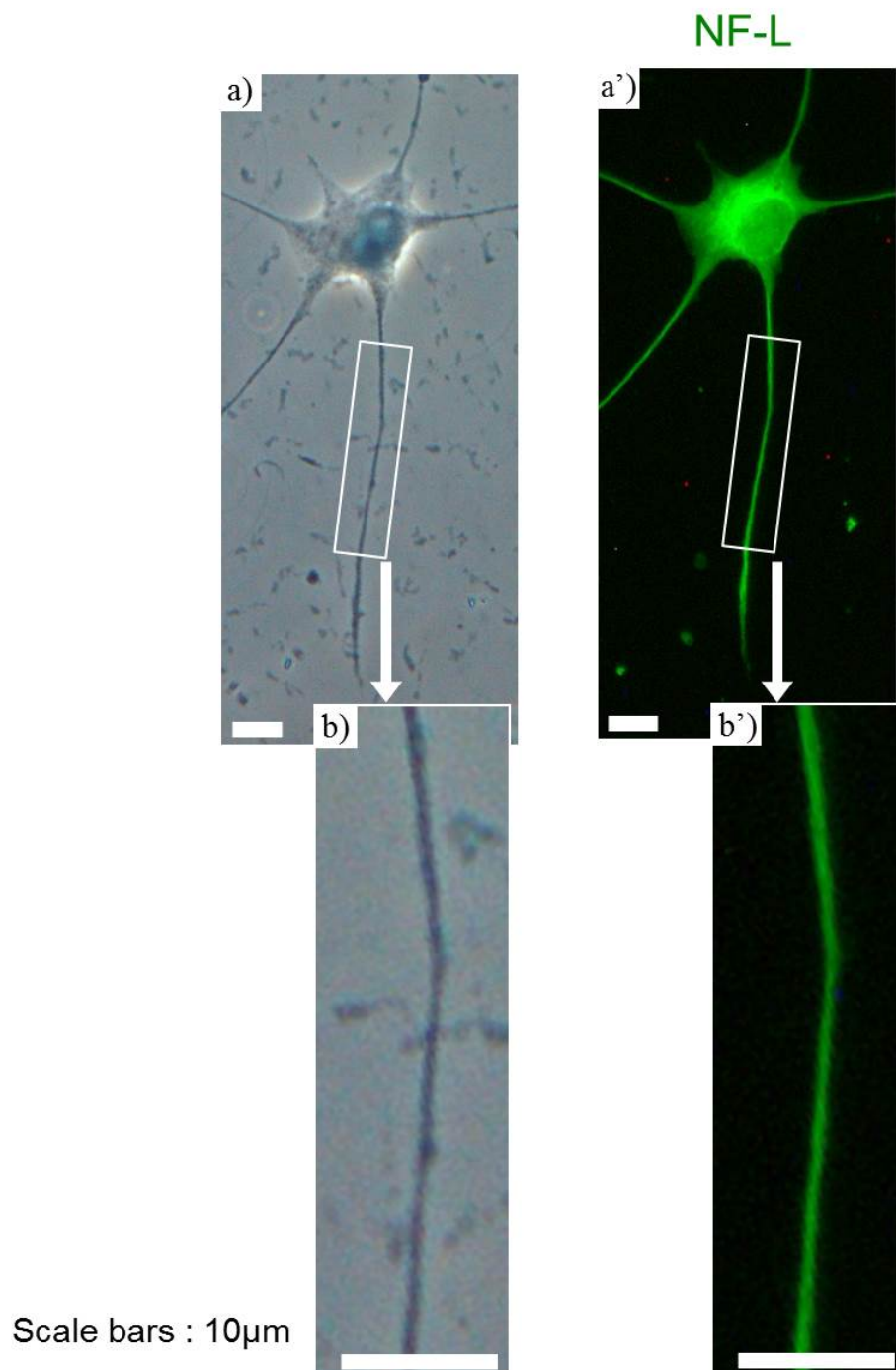
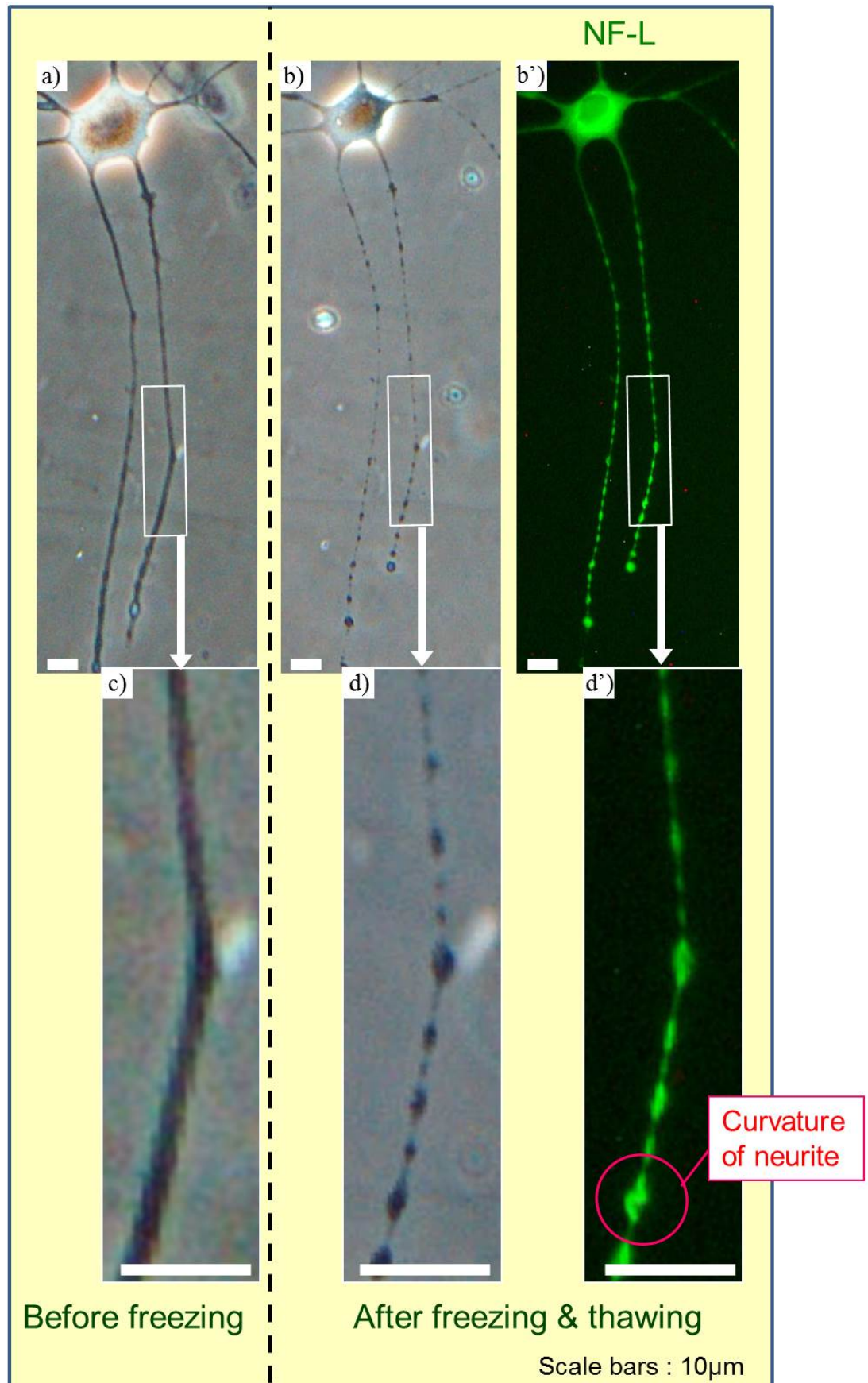


Fig. 3.30. Cells and neurofilament L before freezing



$H=4.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_L=-2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $W\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Fig. 3.31. Cells and neurofilament L after freezing and thawing

因する浸透圧ストレスに注目し、その影響を調べた。Fig.3.32 に、NaCl 濃度の変化過程における細胞の形態変化と等張に戻した後の細胞骨格の形態変化の例を示す。Figs.3.32a~3.32e は、NaCl 濃度の変化過程における細胞の形態変化の例で、Fig.3.32e は等張に戻した Fig.3.32e に対応する NeurofilamentL の画像である。神経突起は、NaCl 濃度が 1M において若干細くなり、希釈過程において数珠状化や短小化を生じた。細胞骨格は、数珠の部分は濃く、数珠周りは薄くなった。また、細胞体は、高張状態で収縮し、希釈過程で再膨張し、球状化した。

次に、浸透圧ストレスによる形態変化の定量的検討として、6 つの神経突起の太さや長さを計測した。それぞれの突起内の一つの数珠状化する部分の太さを時系列に調べ、等張の初期状態の太さで無次元化した結果を Fig.3.33a (突起 1~3) と Fig. 3.34a (突起 4~6) に示し、突起の長さを時系列に調べ、等張の初期状態の長さで無次元化した結果を Fig. 3.33b (突起 1~3) と Fig. 3.34b (突起 4~6) に示す。点線が垂直に変化する部分は、濃度変化の操作を行ったタイミングを表す。まず、突起 1~3 について、いずれの突起も、NaCl 濃度が約 1M で若干細くなり、希釈過程で急激に肥大化し、最終的な数珠部の太さは、約 1.5~2 倍になった (Fig. 3.33a)。この 3 つのいずれの突起も、短小化は 10% 以下となった

(Fig.3.33b)。ほぼ同様の浸透圧変化を与えた場合の突起 4~6 では、数珠状化部分の太さは、突起 4 と 5 は、突起 1~3 とほぼ同等で、約 2 倍程度となったが、突起 6 は、約 3 倍程度まで及んだ (Fig. 3.34a)。長さについては、突起 6 は、数珠状化と対応して、他の突起よりも短小化の度合いが大きく、40% 程度短小化した (Fig. 3.34b)。

さらに、形態変化に対する NaCl 濃度の影響を明確にするために、実際の NaCl 濃度変化を Fig. 3.35 のように仮定して解析した。NaCl 濃度に対する数珠状化部分の太さ変化の例を Fig. 3.36 に示し、突起長さの変化を Fig. 3.37 に示す。まず、突起 1~3 について、いずれの突起も、数珠状部は、等張の初期状態と比べて、NaCl 濃度が 1M において若干細くなり、希釈過程の 0.3~0.4M 以下の範囲で肥大化した (Fig. 3.36a)。この傾向は突起 4~6 でも同様であり、いずれの突起も、希釈過程の 0.3~0.4M 以下の範囲で肥大化した (Fig. 3.36b)。数珠状化と同様に、短小化も、希釈過程の 0.3~0.4M 以下の範囲で生じた (Fig. 3.37)。

3.4.4 凍結・融解後の細胞の生存率

凍結・融解後の細胞の生存率 η の測定結果を Fig. 3.38 に示す。図中、便宜上、非凍結状態 $T_L = 0^\circ\text{C}$ で $\eta = 1.0$ のデータ点を加えてある。 η は、いずれの冷却速度

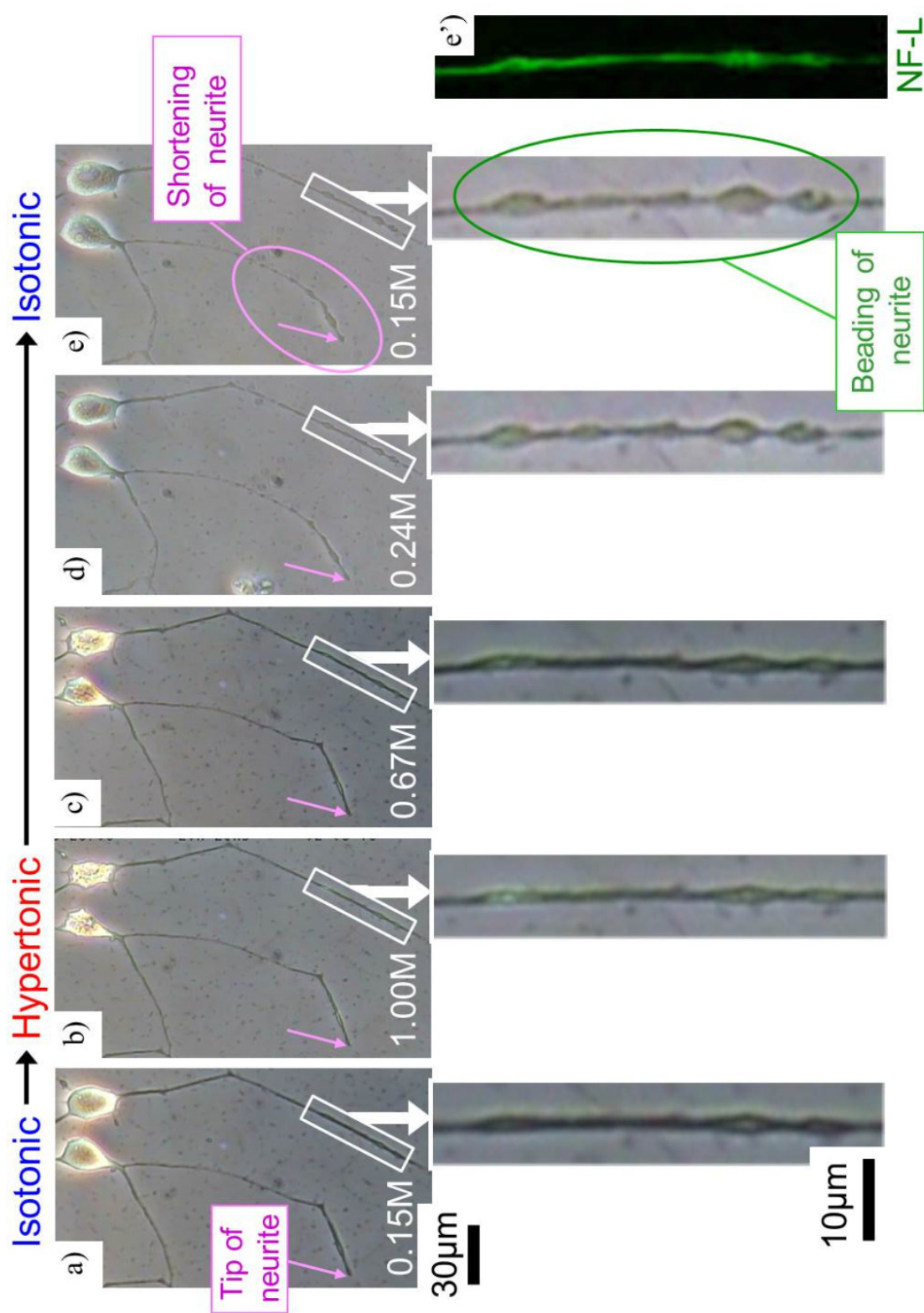


Fig. 3.32 Morphological changes of neurites under osmotic stress

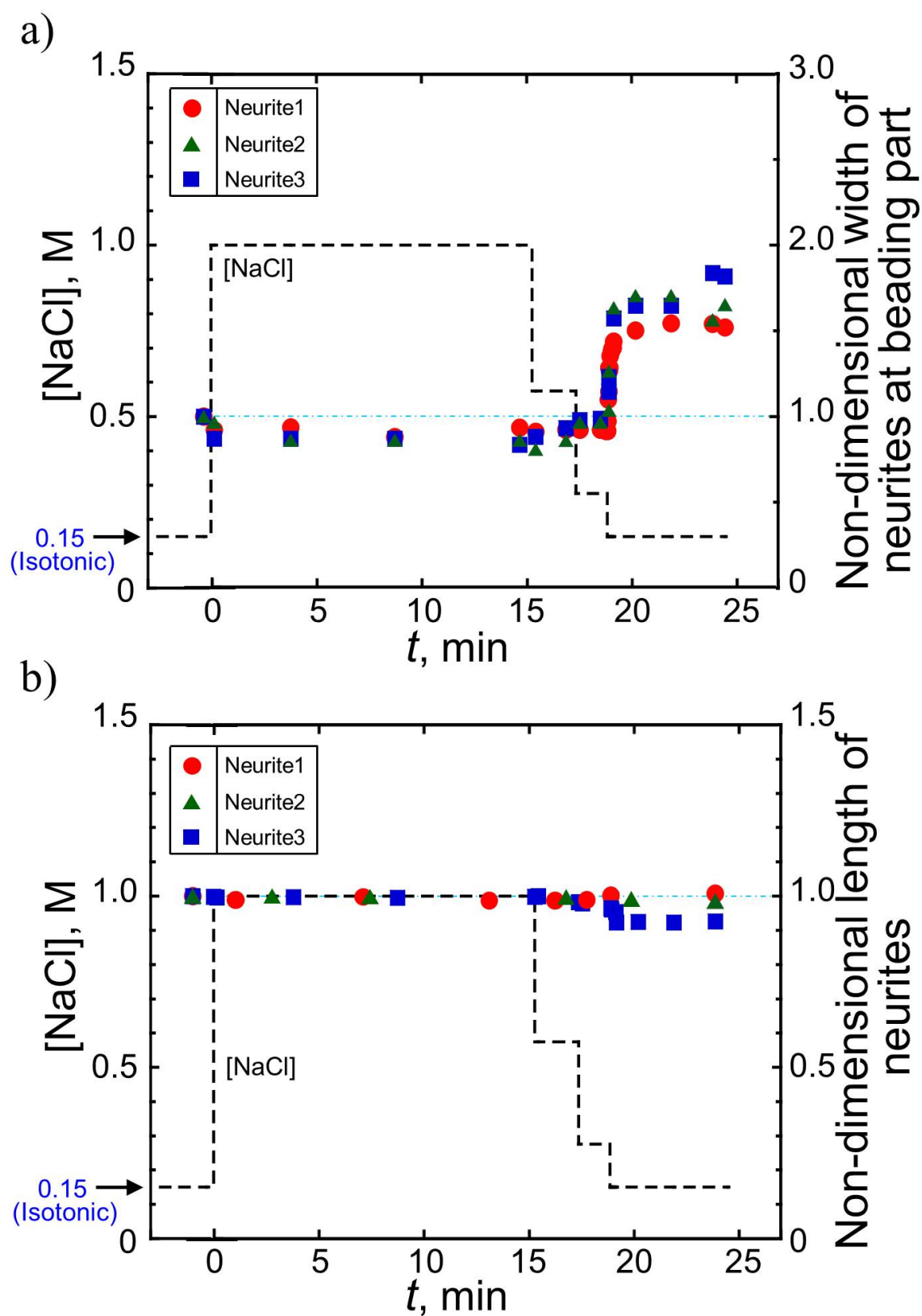


Fig. 3.33 Time-series change of a) width of neurites at beading parts and b) length of neurites under osmotic stress (Neurite1~3)

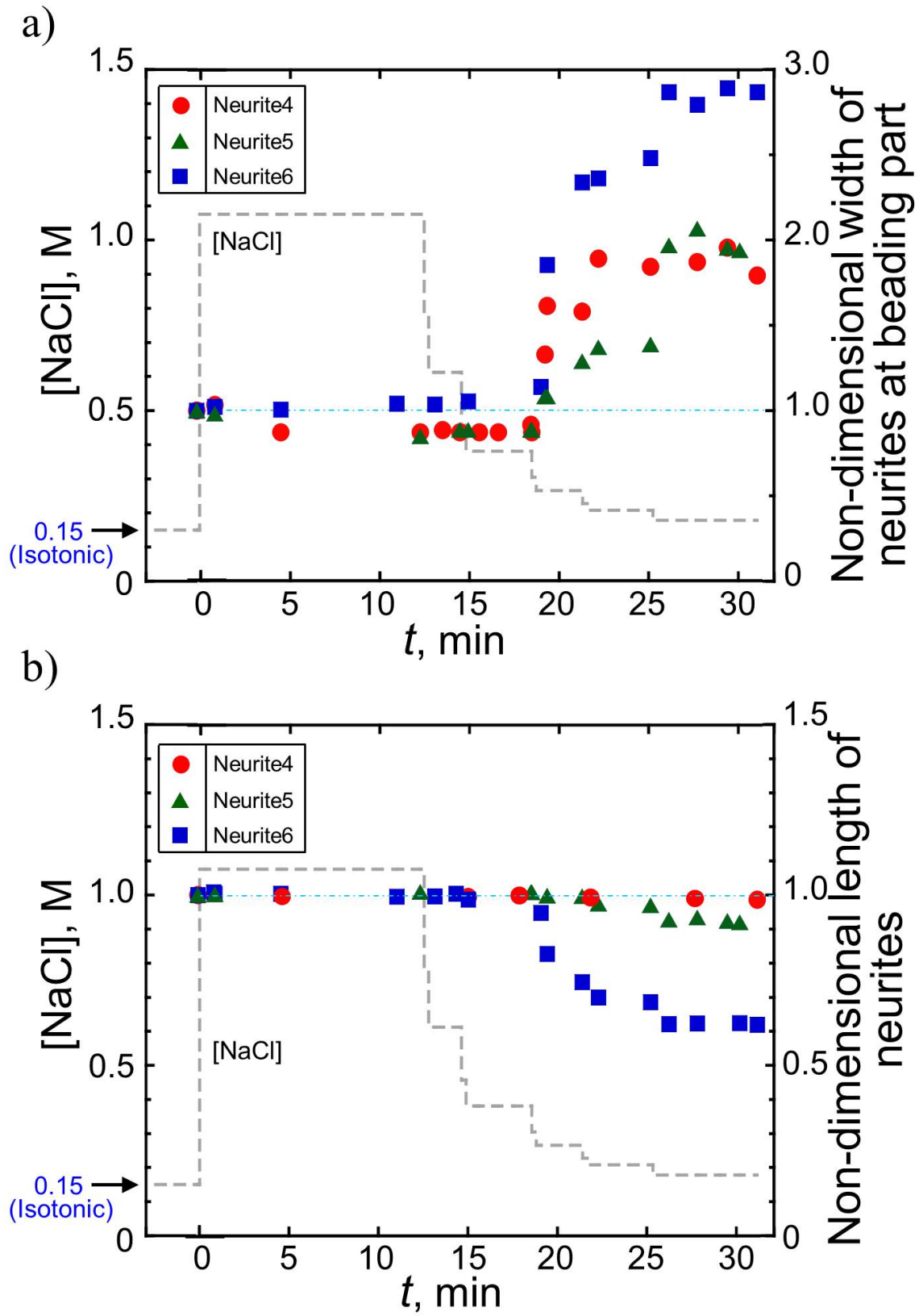


Fig. 3.34 Time-series change of a) width of neurites at beading parts and b) length of neurites under osmotic stress (Neurite4~6)

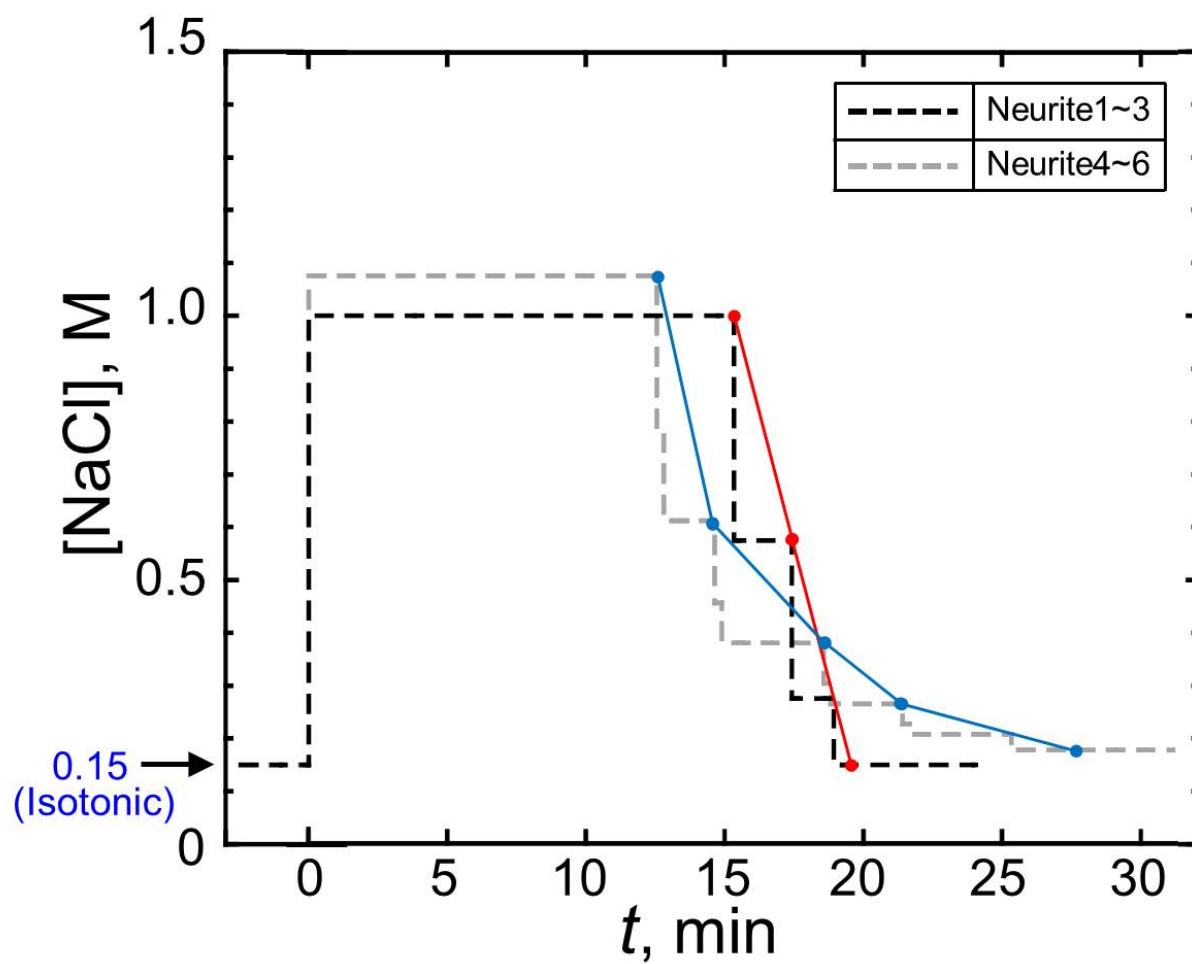


Fig. 3.35 Time-series change of NaCl concentration

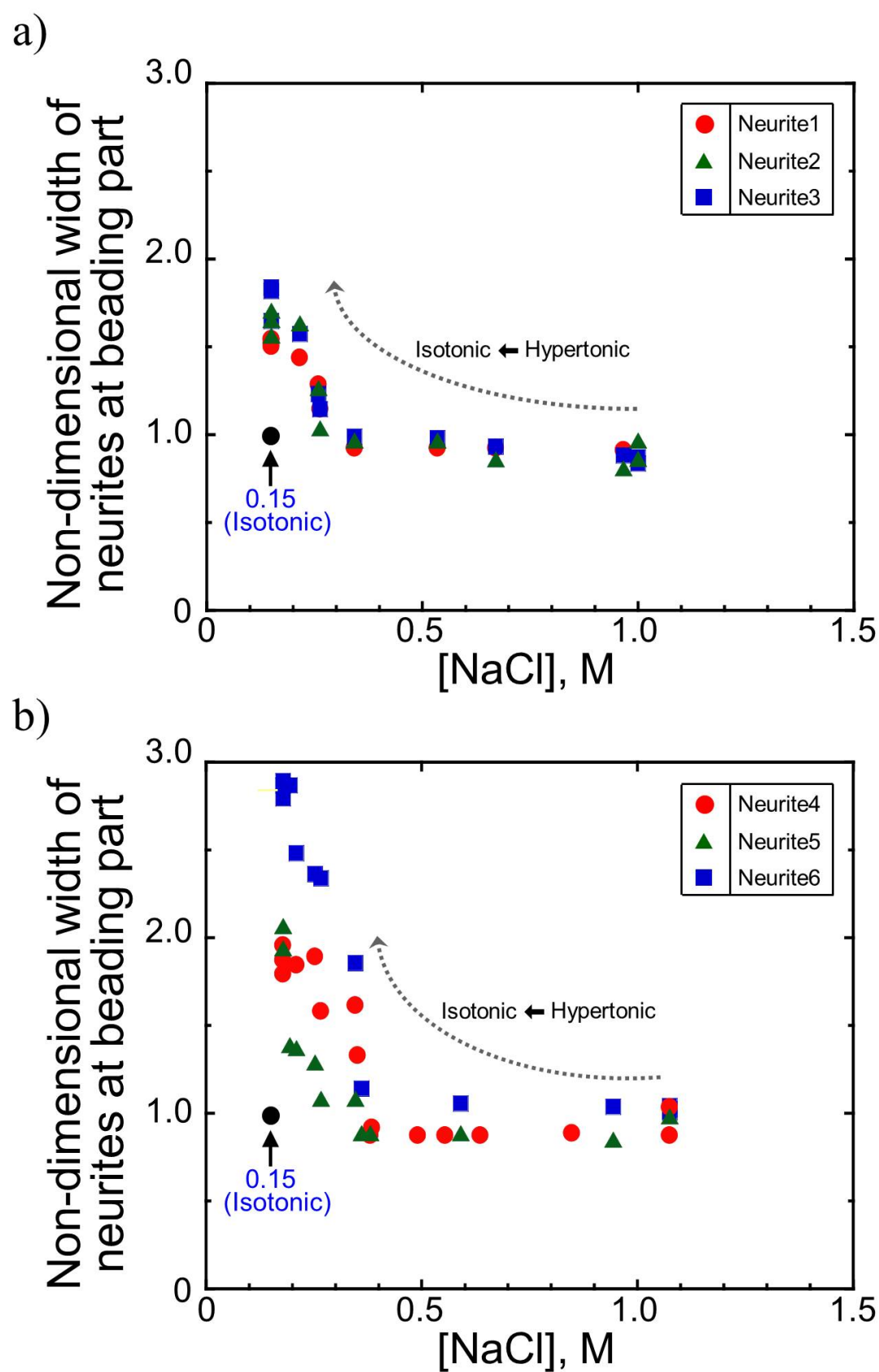


Fig. 3.36 Change of width of neurites at beading part as a function of NaCl concentration for a) Neurite1~3 and b) Neurite4~6

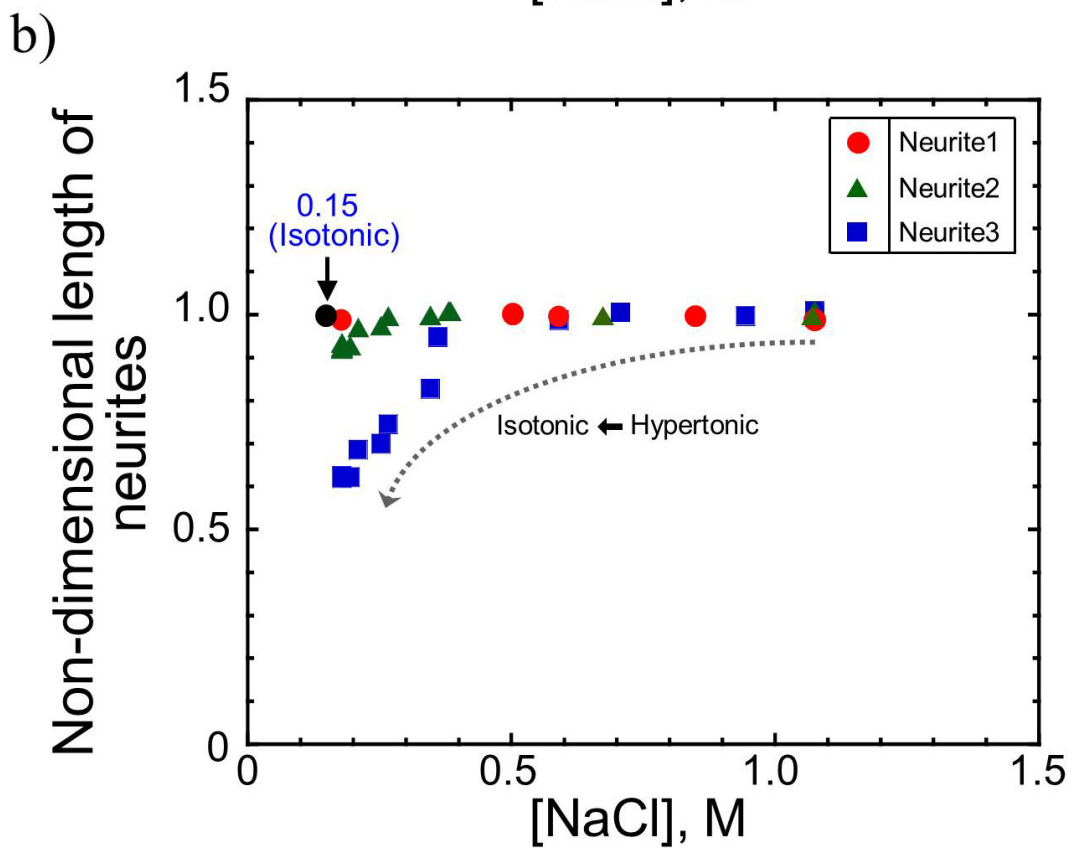
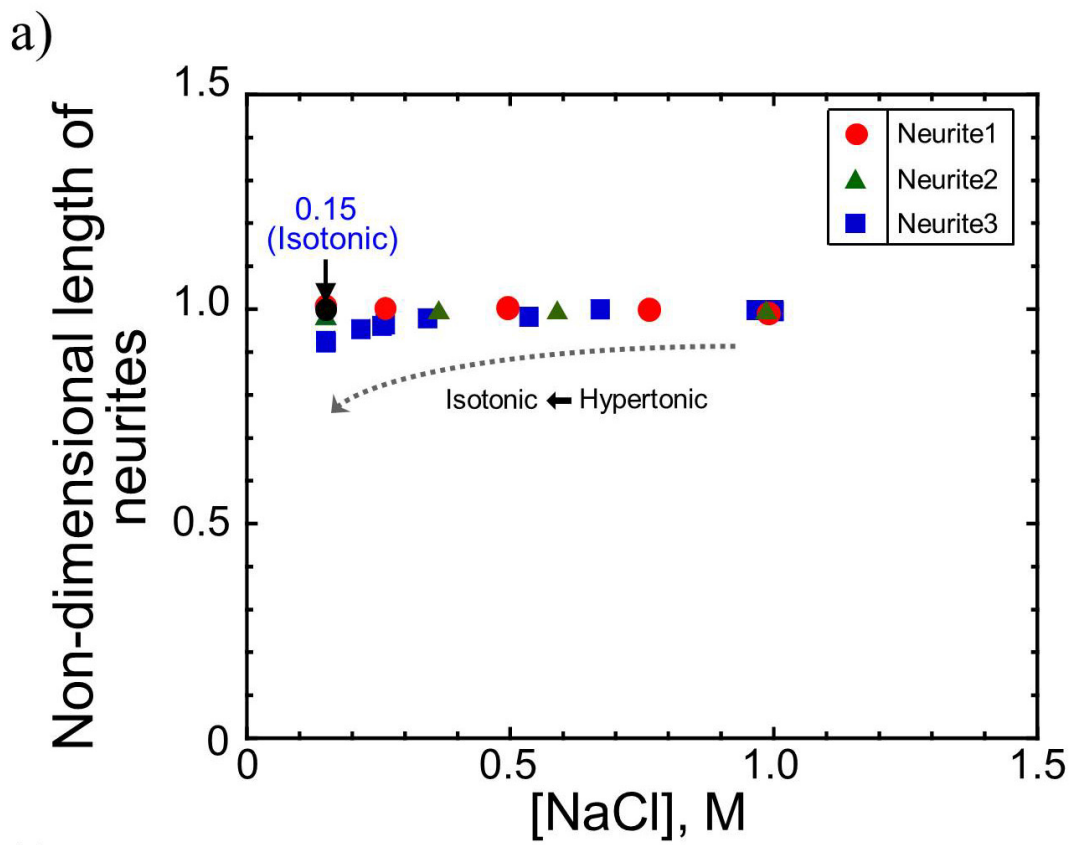


Fig. 3.37 Change of length of neurites as a function of NaCl concentration for a) Neurite1~3 and b) Neurite4~6

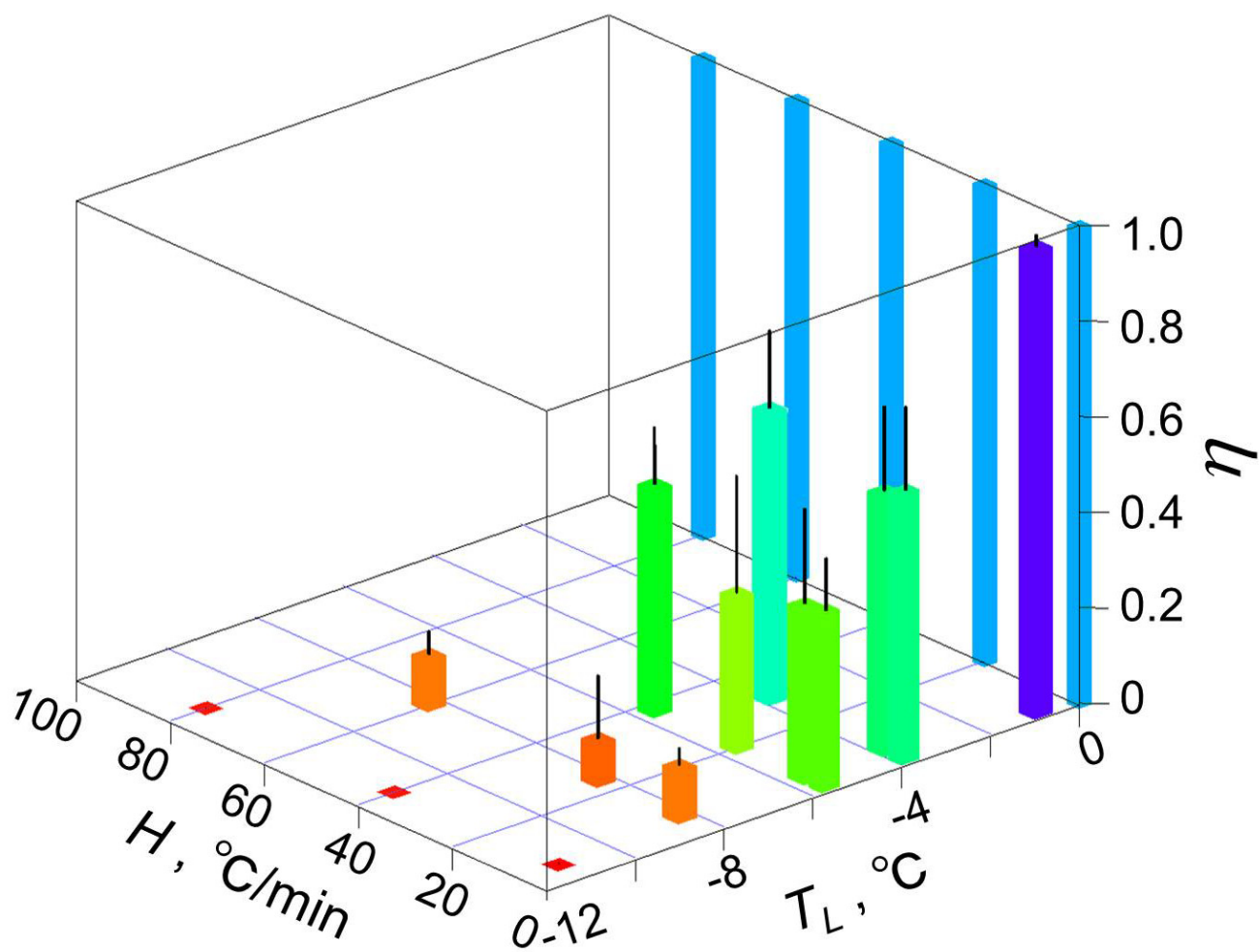


Fig. 3.38 Post-thaw cell viability as a function of T_L and H

でも、 T_L の低下と共に $\eta = 1.0$ から単調に減少した。すなわち、 η は、 T_L の低下に対して、緩やかに減少し始めた後、こう配を急にしつつ減少し($\partial^2 \eta / \partial T_L^2 < 0$)、変曲点($\partial^2 \eta / \partial T_L^2 = 0$)を経て、こう配を緩やかにしつつ減少する($\partial^2 \eta / \partial T_L^2 > 0$)特性を示し、最終的には漸近的に $T_L = -11.2^\circ\text{C}$ で $\eta = 0$ となった。

3.5 考察

3.5.1 細胞外凍結挙動と細胞損傷

凍結挙動の観察に関して、細胞外凍結の場合、細胞体の収縮や神経突起の湾曲などが観察された (Fig. 3.13). 細胞外で氷結晶が成長すると、未凍結水溶液の濃縮により水溶液中の NaCl 濃度が増加する. これに呼応して、細胞外の未凍結水溶液と細胞内水溶液の浸透圧差により、細胞は脱水、収縮し、さらに氷結晶からの機械的作用も加わり、変形する. この過程では、同時に細胞内の水溶液も濃縮され、溶質濃度が増加する. 凍結挙動におけるこの変化は、特に、氷結晶の成長の盛んな温度領域で顕著である. 神経突起も基本的には細胞体と同様の膜構造を有するため、細胞外氷結晶の成長と共に、脱水・収縮する（後で詳しく論ずる）が、元々の細さのため、太さの変化が明瞭ではない.

細胞外凍結によって起こる細胞損傷の機序についてはいくつかの説がある. Lovelock ら^(3.20)は、赤血球を用いた研究から、細胞膜脂質が濃縮塩により一部分解された結果、細胞膜の透過性が増大し、融解時に浸透圧ショックにより溶血を起こす、という塩害説を提唱した. この説は、多くの支持はあるものの、かなりの反論も見られる. また、Meryman^(3.21)は、溶血がそれを引き起こす塩濃度と同じ浸透圧をもつスクロース溶液によってもおこることなどに注目し、塩そのものの細胞膜への害ではなく、脱水による細胞の収縮が損傷の原因であるという、最小容積説を提唱した. この説は、細胞は収縮しうる容積に限界があって、脱水が進行してもその最小容積以下には収縮できず、さらに凍結が進行して細胞内外の浸透圧の差が増大してくると、細胞膜にストレスがかかり、半透過性を失って融解時に溶血するというものである. 一方、凍結過程の細胞は、細胞外の未凍結水溶液中に閉じ込められるが、そこで細胞間あるいは細胞と氷結晶間の機械的な作用により損傷をうけるという、機械的ストレス説^{(3.22)(3.23)}もある. この機械的ストレス説にも批判はあるが、細胞が密接して存在する組織、臓器の凍結を考える上で特に考慮すべきである.

3.5.2 細胞内凍結挙動と細胞損傷

これに対して、冷却速度の増加は細胞内凍結を起こす頻度を増加させる. 暗化は、細胞内水溶液の過冷却状態で氷核生成（過冷却解除）により、微細な氷結晶が多数形成され、細胞内を透過する光を散乱、減衰するためである. 一旦細胞内に氷結晶が形成された後は、細胞内水溶液は濃縮され、ほぼ熱平衡状態に達し、温度低下と共に、細胞内でも氷結晶の成長と未凍結水溶液の濃縮が進む. Figs. 3.13h, 3.14i, 3.15h では、細胞内凍結発生瞬間時（各々 Figs. 3.13d,

3.14d, 3.15d) と比べ、細胞内氷結晶が粗粒化（粒当たりの大きさの増加と数の減少）し、その形態もはっきりする傾向がある。これは、時間経過に伴う温度低下による細胞内の微細な氷結晶の成長とそれによる合体や、温度低下はあるものの時間経過による氷結晶の再結晶化のためであると考えられる。

細胞内凍結では、このような細胞内の氷結晶からの機械的作用や溶液効果によって、細胞内小器官や細胞膜が破壊されることが考えられる^{(3.24)(3.25)}。細胞膜と細胞内氷結晶が接したところで特異的に損傷を受ける証拠は、藤川ら^(3.26)によるヒト赤血球に対するフリーズフラクチャー法を用いた研究により示された。また、Sherman^(3.27)、朝比奈^(3.28)、根井^(3.29)らは、各種細胞について、細胞内氷結晶の大きさと融解後の生存率を比較した結果、細胞内に氷結晶が出来ても、それが極端に小さいうちは細胞に損傷を及ぼさないが、氷が成長してある大きさ以上に達すると損傷をきたすことを示した。従って、急速凍結された細胞の細胞膜、細胞小器官の破壊は、細胞内微小氷結晶の成長と大型化（再結晶）に伴ってもたらされることが考えられている。

3.5.3 細胞内氷結晶の発生位置と伝播

細胞内凍結は、細胞体で優先的に起こり、細胞内を伝播し、冷却速度の増加に対して、神経突起の根元からかなり離れた位置まで氷結晶の形成が及ぶ（Fig. 3.14~3.16）。細胞内凍結が起こる場合でも、まずは、細胞外凍結のみの場合と同様に、細胞周りに氷結晶が先行して発生・成長し、細胞は脱水しつつ収縮する。しかし、冷却速度が高い程、細胞からの脱水とそれによる細胞内水溶液の濃縮が不十分となり、細胞内水溶液は、冷却過程で過冷却を蓄積・増大させ、最終的にその解除により細胞内凍結に至る^{(3.24)(3.25)}。この細胞内凍結メカニズムに鑑みるに、体積／表面積比の大きい細胞体は、体積／表面積比の小さい細長い神経突起に比べ、脱水が進行し難く、冷却・脱水過程で過冷却が蓄積され易く、かつ、体積自体がより大きいため、結果として、優先的に細胞体内で氷結晶が発生し、細胞内を伝播・成長することが考えられる。従って、冷却速度が高い程、細胞内の氷結晶が、細胞体だけでなく、神経突起やその先の方まで及ぶという傾向は、冷却過程における両部位での脱水のしやすさの違いにより、蓄積される過冷却度に差が生じるためである。すなわち、細胞外凍結の進行により、細胞の脱水・収縮は細胞体だけでなく突起部でも起こるが、脱水は細長い形状の突起部でより起こりやすいため、細胞体内に氷結晶が形成される場合でも、低い冷却速度の条件では、突起部での過冷却の蓄積が不十分であり、その中に氷結晶は及ばないのに対し、より高い冷却速度の条件では、突起部にも過冷却が

十分に蓄積され氷結晶が成長する．これに対して、通常の細胞の場合、神経突起のような細長い構造を持たない単純な形態（例えば球状）であるため、細胞内氷結晶は冷却速度によらず細胞全体に伝播する．

3.5.4 凍結・融解後の神経突起の形態変化

凍結・融解後の神経突起には、数珠状化や短小化などの形態変化が生じた (Figs. 3.18 と 3.19)．これらの形態変化は、融解過程から生じ始める場合もあるが、主に融解終了後から生じ始めた ($H=1.0\sim61.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_L = -3.8^{\circ}\text{C}$, -5.6°C , -11.2°C)．突起によってタイミングが若干異なることについては、突起の長さ、分岐の数、接着の強さの違いなどが関与する可能性が考えられる．

以上の変化は、死細胞だけでなく、生細胞でも頻繁に生じるため、細胞にとって必ずしも致命的な傷害ではない (Figs. 3.18 と 3.19)．すなわち、細胞の生死は、核などの主要な細胞小器官が存在する細胞体の損傷に依存し、神経突起に対する損傷のみではほとんど影響されないと考えられる．しかし、短小化では、神経突起間の接続が明確に切断される．また、数珠状化した突起も、培養環境に戻すと、元に戻る場合もあるが (Fig. 3.24)、ちぎれて細胞体から分離する場合もある (Fig. 3.25)．従って、神経突起の形態変化を防ぐことは、凍結・融解後の細胞の品質を向上させる観点から、意義があると考えられる．

また、数珠状部が形成される神経突起上の位置に関しては、Figs. 3.18c と 3.18d, Figs. 3.19c と 3.19d の比較より、凍結前の神経突起の僅かに太い位置（根元部分以外）に対応しているように見受けられる箇所もあるが、今後、形成メカニズムを含めた詳細な検討が望まれる．

形態変化を生じた神経突起では、細胞骨格にも変化が生じた．数珠状化では、細胞の力学的構造を支える中間径フィラメントを構成する Neurofilament L (Fig. 3.31) の分布に濃淡や湾曲が生じる．Fig. 3.31 に矩形で示した突起は、短小化も生じているため、Neurofilament L が長さ方向（軸方向）に圧縮されることにより、数珠状部で湾曲が生じた可能性も考えられる．これまでの報告でも、本研究の凍結の場合同様に、中間径フィラメントが数珠状部に集中して存在するという報告がある^(3.30)．中間径フィラメントは、細胞に機械的強度を与える役割を担うため、以上の変化によって、神経突起の強度に影響が及ぼされる可能性がある．数珠状化した突起では、突起内の物質輸送を担う微小管など、他の細胞骨格繊維にも損傷が生じるという報告もあり^(3.31-3.33)、神経ネットワークの神経情報伝達機能としての点からの検討も必要である．

3.5.5 浸透圧ストレスによる形態変化

浸透圧ストレス（等張→高張→等張）による形態変化は、凍結・融解における形態変化と定性的に同様であるため、浸透圧ストレスが凍結・融解後の細胞の形態変化に大きな影響を及ぼすと考えられる。突起の長さは全体の平均的な特性なので、局所的な特性である太さと比べて変化が小さいが、数珠が大きいほど、短小化の度合いも大きくなる傾向がある。これは、短小化した部分が数珠と融合することにより、数珠が太くなるためと考えられる。

Pullarkat ら^(3.14)は、*in vitro* で培養した PC12 細胞を低張液に曝露し、その状態で維持しながら形態変化を観察した。その結果、低張液でも数珠状化が生じることが明らかとなった。本研究でも、神経突起の数珠状化は、凍結する場合は融解過程または融解後に生じ、浸透圧ストレスに曝す場合では高張から等張へ変化する過程で生じる。従って、浸透圧が下がる過程で生じる、細胞膜を介した水の流入が、数珠状化の形成に関与している可能性がある。本実験条件の範囲では、希釈速度に依らず、ほぼ一定の NaCl 濃度（0.3~0.4M）で神経突起の形態変化が生じ始めたため、水の流入する速度よりも量が重要であることが示唆される。

3.5.6 神経突起の形態変化に関する従来の研究

神経突起の数珠状化や短小化は、*in vivo* と *in vitro* を問わず、他のストレスや疾患でも発生する。数珠状化は老化^(3.34)、アルツハイマー^(3.35)、脳虚血^(3.36)、機械的障害^(3.37-3.41)、薬剤障害^(3.42)などに関連し、短小化はアルツハイマー^(3.43)、機械的障害^(3.44)、薬剤障害^(3.45)などに関連して生じることが報告されている。その現象に対して、分子レベルでの詳細な形成メカニズムについては様々なモデルが提示されてきた。これらのモデルでは、局所的な細胞骨格の損傷による突起内物質輸送傷害^{(3.31-3.33)(3.39)}、膜の張力^{(3.44)(3.46)}の関与などが指摘されてきたが、未だに統一的な説明は出来ていない^{(3.40)(3.47)}。また、数珠状化した突起が崩壊する過程の時間的・空間的依存性、可逆的な数珠状化と不可逆的な数珠状化の境界、数珠状化と突起の傷害の因果関係についてもよく分かっていない^(3.47)。

3.5.7 凍結・融解後の生存性と形態変化の冷却条件に対する依存性

生存率は、冷却速度の高い方が低い場合に比べ、やや大きい傾向を示すものの（Fig. 3.38）、形態変化や細胞の死滅は、冷却速度にはあまり顕著には影響されず、最低到達温度の低下に対して助長された（Figs. 3.28, 3.29, 3.38）。これは、以下の理由による。すなわち、本実験条件では、生存率が低下する最低到達温

度の範囲に注目しているため、最低到達温度は比較的高く、冷却速度が高い場合でも凍結様式は主に細胞外凍結であると考えられる。また、細胞内凍結が生じた場合でも、氷結晶は細胞体内か突起の根元までしか及んでおらず、神経突起部分の凍結様式は概して細胞外凍結である (Fig. 3.23)。従って、細胞外凍結による細胞損傷の観点から、最低到達温度の低下は、細胞の経験する温度低下だけでなく、電解質濃度の増加とそれによる細胞の脱水・収縮・変形の助長（溶液効果の促進）（融解過程では、復水・再膨張の助長）、氷結晶からの機械的作用の増加と共に、これらストレスに曝される時間が長くなるため、結果として損傷が増大し、形態変化が助長される。さらに、本研究では、冷却過程と加温過程の間の最低到達温度での滞在時間が 10 分であり、加温速度も 20~30°C/min と必ずしも高くなく、冷却過程以外の影響を受ける時間が長いため、冷却速度依存性が明確でないと考えられる。

Souzu ら^(3,48)は、ヒト赤血球に対して、緩速冷却 ($H = 1.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、従って、凍結様式は細胞外凍結) 後、即座の急速加温 ($W = \sim 550^{\circ}\text{C}/\text{min}$) の場合の生存率を調べた。その結果、定性的には本研究の場合と同様に、最低到達温度に対して単調減少する S 字状の生存曲線を示した。しかし、本研究結果と比べ、定量的には生存曲線がより低温の範囲まで広がる特性を示し ($T_L = -20.0^{\circ}\text{C}$ で、 $\eta = 0$)、生存率が高かった。これは、細胞の違いに加え、本研究の実験条件に比べ、最低到達温度での滞在時間が零で、加温速度が非常に速いことも一因であると考えられる。

3.6 まとめ

創薬分野において応用上重要な、基質に付着した神経細胞の凍結に関する基礎的特性を理解することを目的とし、神経様細胞を用い、生理食塩水中における凍結挙動を調べると共に、凍結・融解後の細胞の形態変化とそれに及ぼす浸透圧ストレスの影響を調べ、さらに凍結・融解後の細胞の生存性を調べた。まとめは以下のとおりである。

- 1) 凍結様式は、他の一般的な細胞と同様で、定性的に、冷却速度が低い場合には細胞外凍結であり、冷却速度の増加に従って、細胞内凍結の発生頻度が増加する。
- 2) 細胞外凍結では、細胞体と神経突起は、共に脱水・収縮・変形する。この過程で、細胞体と神経突起は、溶液効果と氷結晶からの機械的作用が原因する損傷を受ける。
- 3) 細胞内凍結は、細胞体で優先的に起こり細胞内を伝播し、冷却速度の増加に対して、神経突起の根元、さらには根元から先端に向かう離れた位置まで氷結晶が及ぶ。これは、冷却過程における細胞体と神経突起の両部位での脱水のしやすさの違いにより、蓄積される過冷却度に差が生じるためである。本過程では、細胞内の微細な氷結晶からの機械的作用や溶液効果が主な損傷原因である。
- 4) 凍結・融解後の細胞には、神経突起の数珠状化や短小化、細胞体の輪郭の不明瞭化などの形態変化が生じ、冷却速度に対する明確な依存性は見られず、最低到達温度の低下に対して助長される傾向を示す。
- 5) 神経突起の形態変化は、死細胞だけでなく、生細胞でも頻繁に生じるため、細胞の生死との相関性はなく、従って、細胞にとって必ずしも致死的な傷害ではないが、神経細胞間の情報伝達能への影響に関する検討が望まれる。
- 6) 凍結・融解後の形態変化を生じた神経突起では、細胞骨格にも変化が生じる。細胞に機械的強度を与える役割を担う中間径フィラメントの神経突起内の分布に、数珠状化や短小化に対応した同様の変化が生じる。
- 7) 浸透圧ストレス（等張→高張→等張）により、凍結・融解の場合と定性的に同様の形態変化（神経突起の数珠状化と短小化）が生じるため、浸透圧ストレスが凍結・融解後の細胞の形態変化に大きな影響を及ぼすと考えられる。これらの変化は、本研究の実験条件の範囲では、希釈過程における NaCl 濃度が一定の範囲内で起こる。
- 8) 凍結・融解後の細胞の生存率は、最低到達温度の低下と共に単調減少する。従って、細胞の死滅は、細胞の形態変化と同様に、最低到達温度の低下と共に助長されるが、本研究では、生存率が変化する比較的高い温度範囲に注目して

いるため、凍結様式は主に細胞外凍結であり、従って、凍結様式の違いに起因するような影響が少ないため、本実験条件の範囲内では、細胞の形態変化や生存率の冷却速度依存性が小さい。

第 4 章

神経様細胞の凍結・融解特性に 対する凍結保護物質の効果

4.1 緒言

前章では、創薬分野において応用上重要な、基質に付着した神経細胞の凍結・融解特性を理解することを目的とし、まずはその第一段階として、細胞回りの水溶液環境を生理食塩水として、神経様細胞の凍結挙動を調べると共に、凍結・融解後の細胞の形態変化と生存性を調べた。しかし、生存率は、最低到達温度が約 -11°C でほぼ 0 となり、凍結保存の観点からは非常に低い。

Ma ら^(4.1)による、*in vitro* で神経ネットワークを形成した初代神経細胞に対する凍結保存の研究においても、凍結保護物質を用いない場合では、生存率が非常に低い。凍結保護物質 (DMSO やトレハロース) を加えることで、生存性は 10 倍以上に上昇した。

本章では、前章で調べた生理食塩水中の神経様細胞の凍結・融解特性に対する凍結保護物質の効果を調べる。細胞回りの水溶液に DMSO を添加した環境で、冷却速度を変化させ、凍結・融解挙動を観察すると共に、凍結・融解後の細胞の形態変化と生存性を調べ、前章で検討した生理食塩水中の場合と比較する。

4.2 実験材料およびその準備

4.2.1 実験材料

第3章と同様に、第2章で増殖・分化特性を調べた神経細胞モデルである PC12 細胞を用いた。

4.2.2 PC12 細胞の継代培養と分化誘導

未分化型 PC12 細胞の継代培養と分化誘導は、「3.2.2」項と同様の方法で行った。

凍結実験に使用する接着状態の未分化型 PC12 細胞の準備のためには、ディッシュ内に設置した PCS に継代培養過程の細胞を、約 $3 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の細胞数密度で播種し、継代培養時の培地で、 37°C 、 $10\% \text{CO}_2$ 環境下で培養する。培養開始から 48 時間後、細胞が PCS に十分に接着した状態の未分化型 PC12 細胞を凍結実験用の試料とした。

4.3 実験装置および方法

4.3.1 凍結保護物質

実験に用いる凍結保護物質は、初代神経細胞の懸濁状態での凍結保存で最も広く用いられている細胞膜透過型凍結保護物質である DMSO とする。初代神経細胞の凍結保存のほとんどの成功例では、動物種に依らず、7~10v/v% の DMSO を添加した溶液中で、約 1°C/min の緩速凍結保存を行っている。2~4v/v% の DMSO では、10v/v% よりも、生存性が低下することがラット胎児神経細胞において報告され^(4.2)、牛胎児大脳皮質神経細胞でも、4v/v% または 8v/v% の DMSO では、10v/v% よりも生存性が低下することが報告されている^{(4.3)(4.4)}。また、ラット^(4.5)、ウシ^(4.4)、ヒト^(4.6)の神経細胞で、15~20v/v% 以上の DMSO では生存率が低下するという報告がある。以上を踏まえ、本章では、細胞回りの水溶液環境を、10% v/v DMSO を添加した水溶液とする。

4.3.2 凍結挙動の観察

CS 上の付着した分化型 PC12 細胞に対して、培地を除去し、DMSO（和光純薬工業社製、日本）を 10v/v% 添加した生理食塩水（PS+DMSO）（NaCl 濃度は 0.154M に補正）を用い、洗浄（同量の PS+DMSO を加え、約 1 分間放置し、除去）を 2 度行った。その後、CS の側壁を取り外し、CS を傾斜させ、残留水溶液を除去した後、PS+DMSO を約 15μl 加え（付着細胞と PS+DMSO から成る試料で 20μl 相当）、その上から GCS（18×24mm）で覆い、凍結挙動観察のための試料（厚さ約 45μm）とした（Fig. 3.8）。この試料を、方向性凝固ステージ上で凍結させ、その挙動を撮影・記録した。温度条件は、温度勾配 G が約 13~19°C/mm に対して、試料の移動速度 V （0.41~3.52mm/min）を変化させ、冷却速度 $H = 5.4, 33.6, 68.4^\circ\text{C}/\text{min}$ とした。

4.3.3 凍結・融解後の細胞の形態変化の観察と生存率の測定

一様温度分布ステージを用い、凍結・融解後の細胞に関して、形態変化の観察と生存率の測定を同時に行った。方法は、基本的に「3.3.3.2」項と同様であり、以下に概要を述べる。

基質に付着した細胞の試料作製について、分化型 PC12 細胞、または未分化型 PC12 細胞が付着した PCS をディッシュから取り出し、パラフィルム上に設置し、PS+DMSO または DMSO を 10v/v% 添加した分化誘導時の培養液（M+DMSO）（NaCl 濃度は 0.154M に補正）に PI を 2μM 添加した水溶液を用い、洗浄（PS+DMSO または M+DMSO を 100μl を加え、約 1 分間放置し、除去）を 2 度行っ

た．その後、PCS を傾斜させ、残留水溶液を除去した後、PS+DMSO または M+DMSO を約 5 μ l 加え細胞と水溶液から成る試料（約 10 μ l）が付着した PCS の上面と下面を GCS (ϕ 18) で覆い、周りを 3 重の両面テープで封鎖した（試料厚さ約 60 μ m）（Fig. 3.10）．

懸濁状態の未分化型 PC12 細胞の試料作製について、継代培養過程の細胞の培地を吸引後、0.05% Trypsin-EDTA を 300 μ l を加え、インキュベータ（37 $^{\circ}$ C、3 分間）内に置いた後、培地を加え、ピッペティングにより細胞をディッシュから剥離した．次に、遠心機で細胞を沈殿させた後、上部の水溶液を吸引し、洗浄（PS+DMSO を 100 μ l を加え、約 1 分間放置し、除去）を 2 度行った．その後、細胞を PS+DMSO で懸濁し、PCS の上面にその懸濁液を約 10 μ l 滴下し、PCS の上面と下面を GCS (ϕ 18) で覆い、周りを 3 重の両面テープで封鎖した（試料厚さ約 60 μ m）（Fig. 3.10）．

試料は、一様温度分布ステージにより、 $H = 0.1 \sim 74.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ （M+DMSO の場合は、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のみ）で、 $T_L = -80.0^{\circ}\text{C}$ まで冷却され、そこで 10 分間滞在後、 $W \sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で、 20°C まで加温された．定点における凍結・融解過程の挙動を時系列に撮影・記録し、融解終了後 15~30 分の間に、 $\sim 20^{\circ}\text{C}$ で、微分干渉画像と蛍光画像を撮影した．

凍結・融解後の細胞の形態変化（神経突起の数珠状化と短小化）の定量化として、「3.3.3.1」項と同様に、1) 数珠状部の太さ、2) 数珠状化した突起長さ 100 μ m 当たりの数珠の個数（数密度）、3) 神経突起の長さを計測した．また、細胞の生死判別には、「3.3.3.1」項と同様に、細胞膜の色素（PI）排斥能に基づいた評価を行った．

4.3.4 免疫細胞化学染色による細胞骨格の観察

CS 上の分化型 PC12 細胞に対して、「4.3.2」項と同様の手順で試料を準備した．試料は、方向性凝固ステージにより、 $H = 5.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で、 $T_L = -37.1^{\circ}\text{C}$ まで冷却され、そこで 10 分間滞在後、 $W \sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で、 20°C まで加温された．凍結・融解後、「3.3.5」項と同様の方法で免疫細胞化学染色を行った．

4.3.5 統計的解析

「4.3.3」項で述べた、形態変化の定量的検討と生存率の測定では、基本的に 1 条件当たりの繰り返し回数を 3~7 回とし、実験 1 回当たり、測定試料中の 5 スポット（1 スポットの面積は 0.14mm^2 ）を対象とした．ただし、接着した未分化

型 PC12 細胞の生存率の測定実験では，実験回数は 1 である．結果は，平均値±標準誤差で表記し，平均値間の有意差の判定は，t 検定によって行った．

4.4 実験結果

4.4.1 凍結挙動

PS+DMSO 中の分化型 PC12 細胞の方向性凝固過程における凍結挙動の代表例を、冷却速度に対して Figs. 4.1~4.3 に示す。各冷却条件での観察の温度領域は、未凍結状態から低温側は概ね $-15 \sim -35^{\circ}\text{C}$ に及ぶ。

4.4.1.1 細胞内凍結を伴わない場合

本実験で冷却速度が最も低い $H = 5.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Fig. 4.1) の場合、凍結様式は、細胞外凍結となった。Figs. 4.1a と 4.1b で凍結領域の先端 (Fig. 4.1a の画像下の太い矢印) が未だ及ばない未凍結状態では、細胞全体の形態が明瞭であるが、Fig. 4.1b で細胞が凍結領域に取り込まれ、さらに、Figs. 4.1c, 4.1d, 4.1e へと温度が低下するに従って、細胞体は、若干、脱水・収縮・変形した。凍結過程における神経突起の脱水・収縮は元々の細さのために明瞭ではなかった。生理食塩水中で細胞内凍結を伴わない場合 (Fig. 3.13f) と比較すると、Fig. 4.1e では、細胞の形態はより明瞭であり、氷結晶との相互作用による神経突起の湾曲などの変形も認められなかった。

4.4.1.2 細胞内凍結を伴う場合

Fig. 4.1 の場合より冷却速度が高い $H = 33.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Fig. 4.2) , $68.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Fig. 4.3) の場合、凍結過程で、細胞外凍結に加え、細胞内に氷結晶が発生・成長する細胞内凍結を伴い、冷却速度の増加に対しその発生頻度が増加した。例えば、Fig. 4.2 中、円で示す細胞が、Fig. 4.2d ($\Delta T = -28.43^{\circ}\text{C}$) で細胞内凍結 (細胞内凍結の瞬間を示す) を起こした。Fig. 4.2 の場合に比べ冷却速度が約 2 倍である Fig. 4.3 では、円で示す細胞は、Fig. 4.3d ($\Delta T = -11.65^{\circ}\text{C}$) で細胞内凍結を起こした。これに対して、Figs. 4.2 と 4.3 中の他の細胞は、観察した範囲内では、細胞内凍結を伴っていないようであるが、「3.4.1.2」項の場合と比較して、細胞外の氷結晶の形態が非常に細かいため、全体的に光が散乱され、氷結晶下の細胞の形態変化はほとんど観察出来なかった。また、本実験では、細胞内氷結晶が細胞内のどの部位まで伝播しているかも観察出来なかった。

4.4.2 凍結・融解後の細胞の形態変化

凍結・融解後の細胞の位相差画像と PI 染色による蛍光画像の代表例を、凍結前の位相差画像と共に、Figs. 4.4~4.7 に示す。各図中 b に矢印と矢頭で示すように、いずれの冷却速度でも、凍結・融解後、若干の形態変化 (神経突起の短小

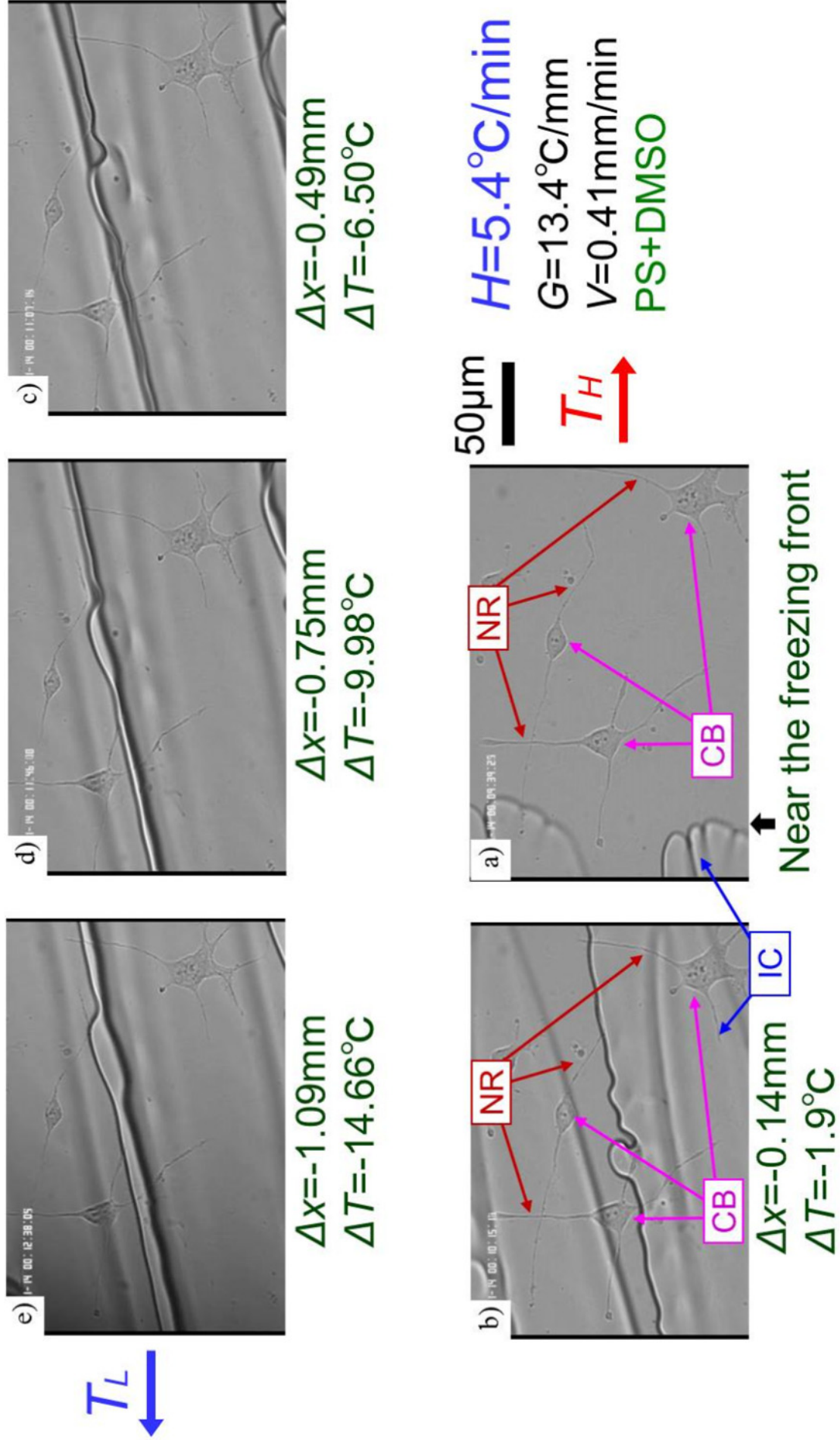


Fig. 4.1 Freezing behavior of cells (1)

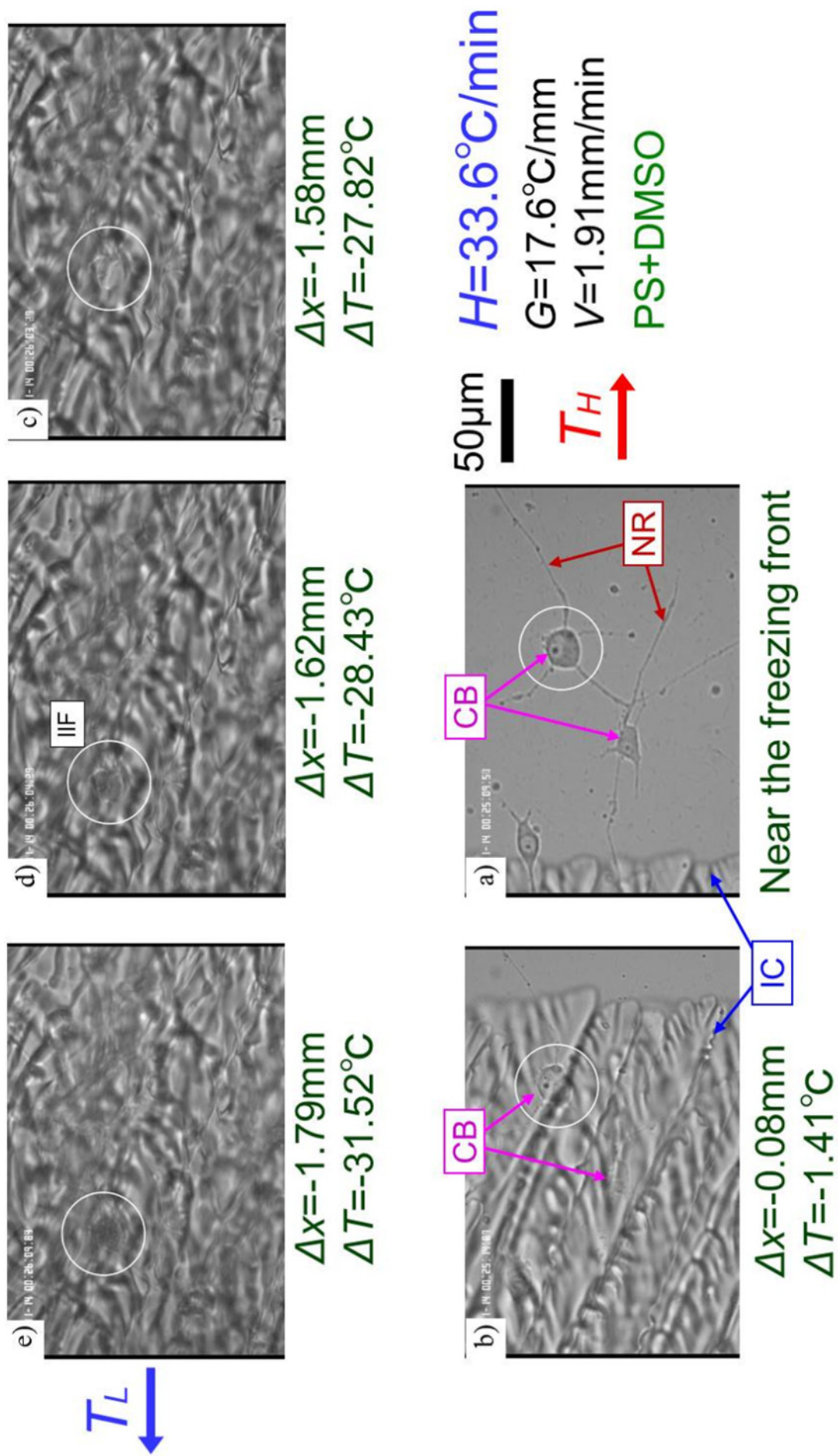


Fig. 4.2 Freezing behavior of cells (2)

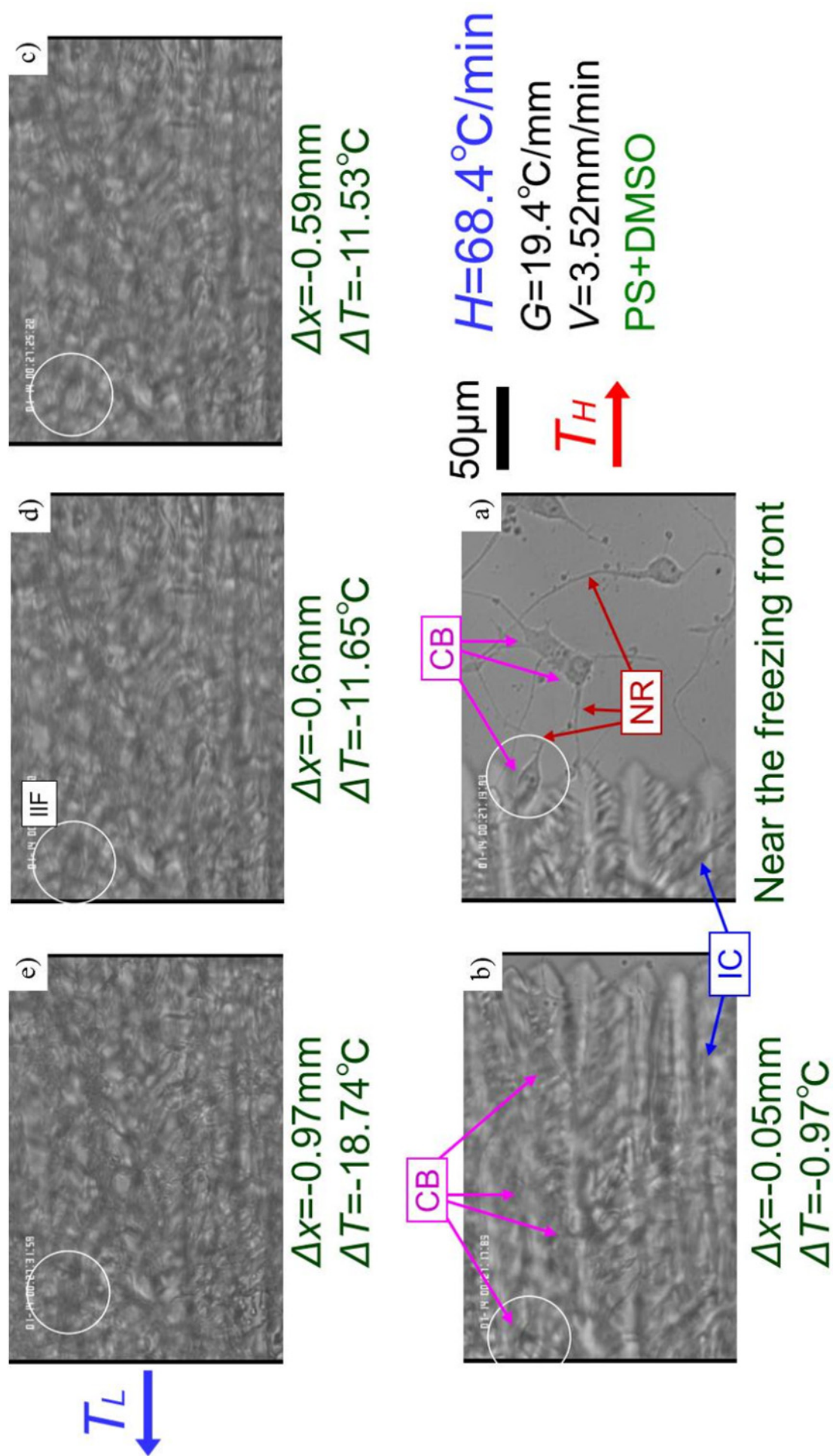


Fig. 4.3 Freezing behavior of cells (3)

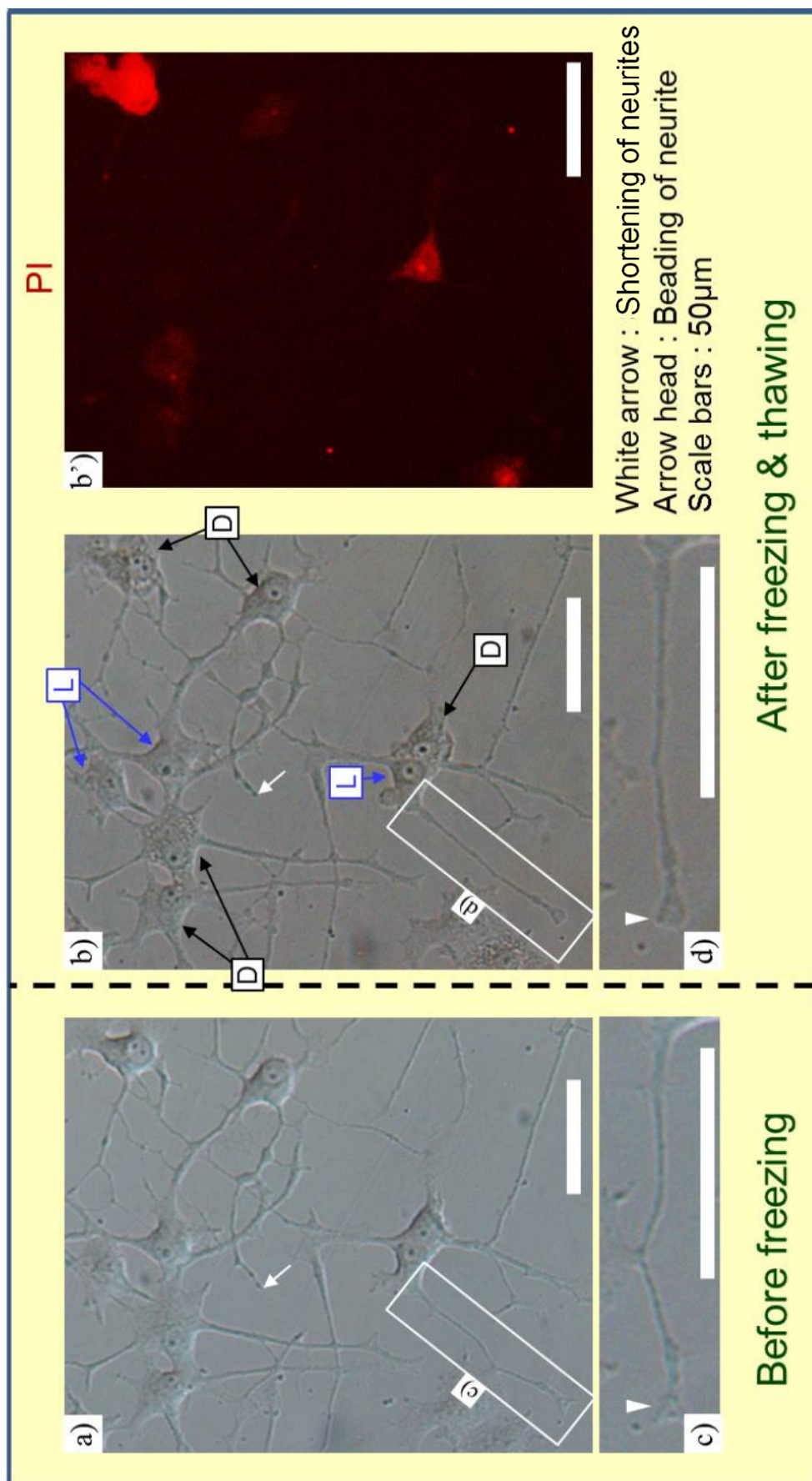


Fig. 4.4 Comparison in cell morphology between before freezing and after freezing and thawing, and life and death of post-thaw cells (1)

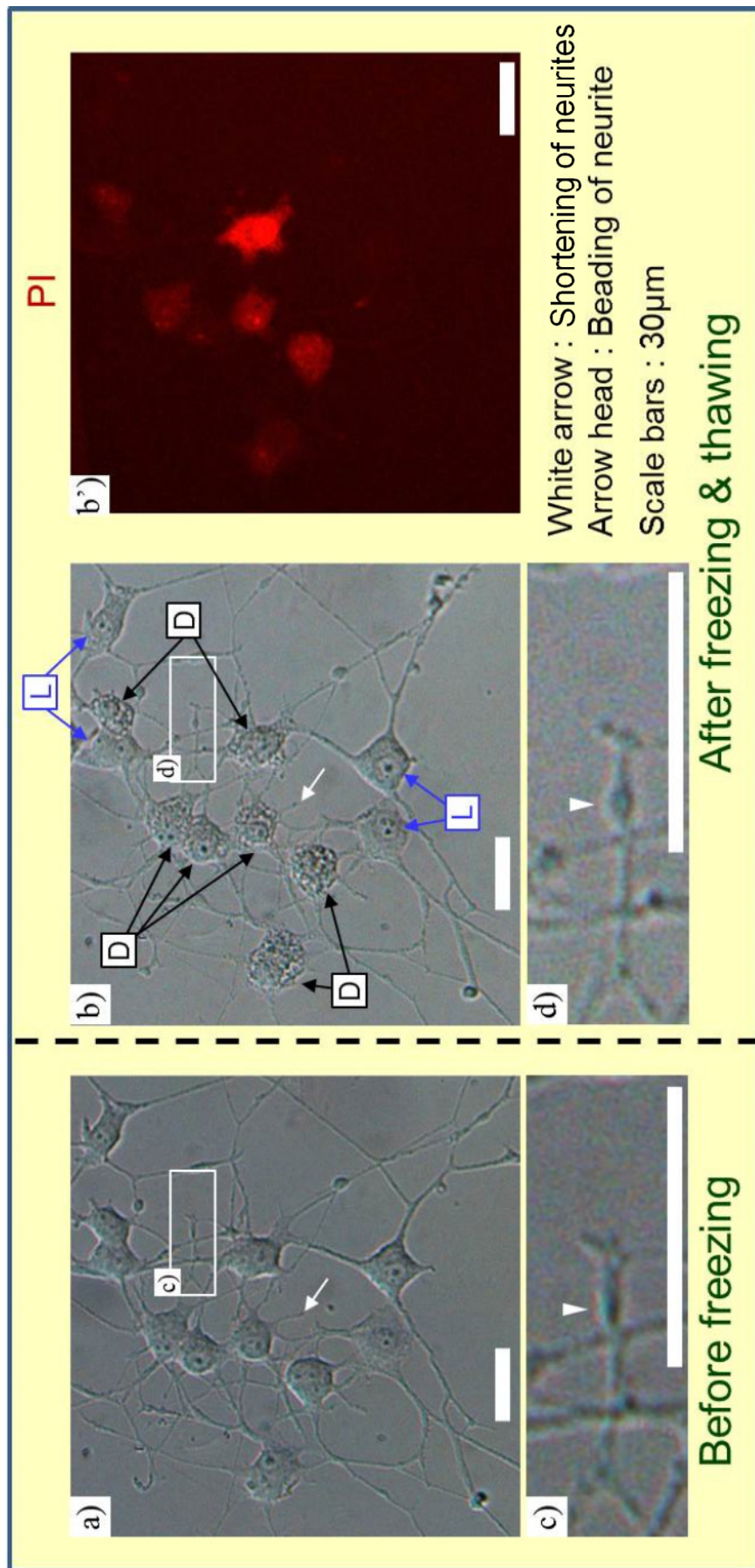


Fig. 4.5 Comparison in cell morphology between before freezing and after freezing and thawing, and life and death of post-thaw cells (2)

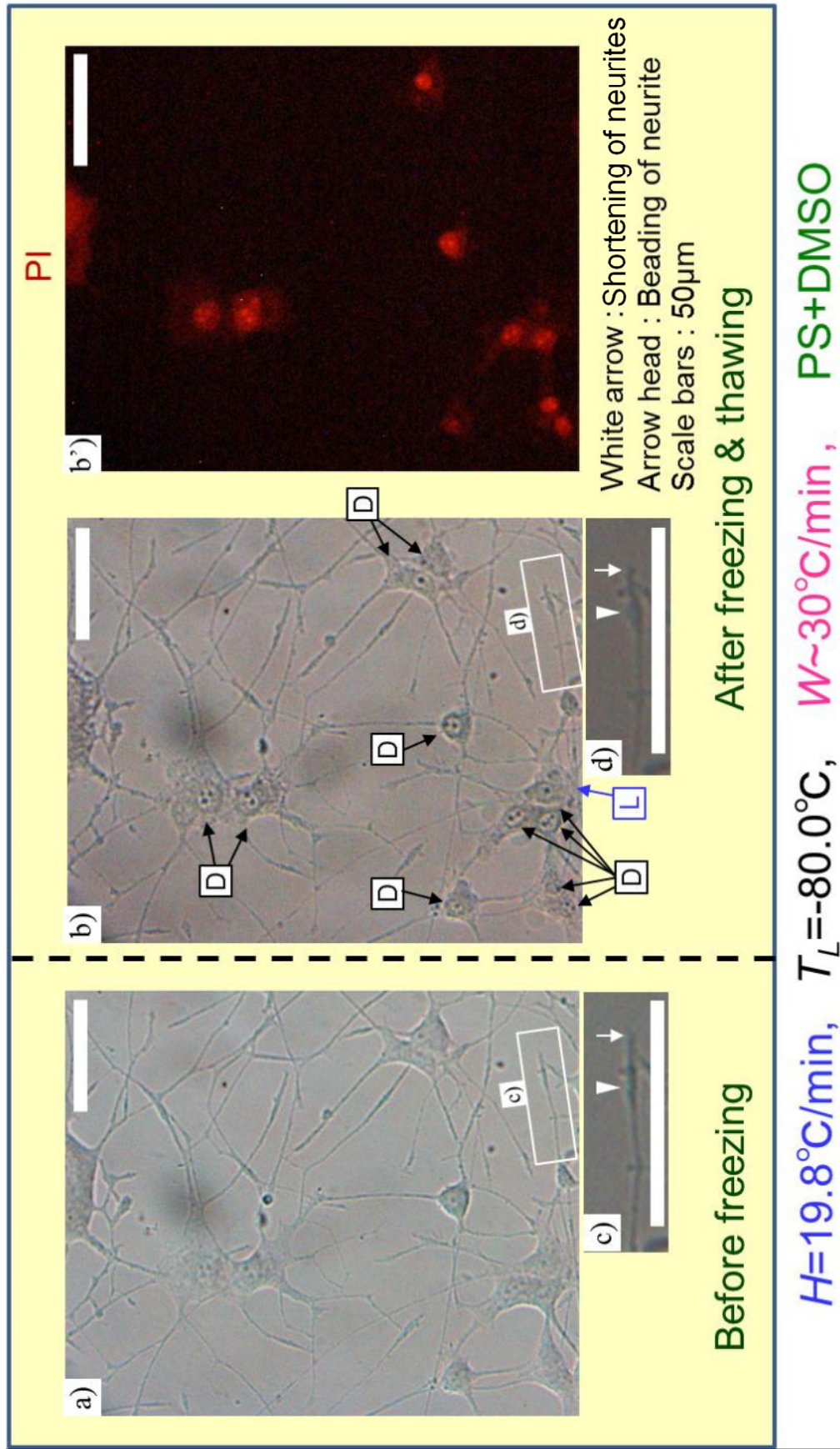


Fig. 4.6 Comparison in cell morphology between before freezing and after freezing and thawing, and life and death of post-thaw cells (3)

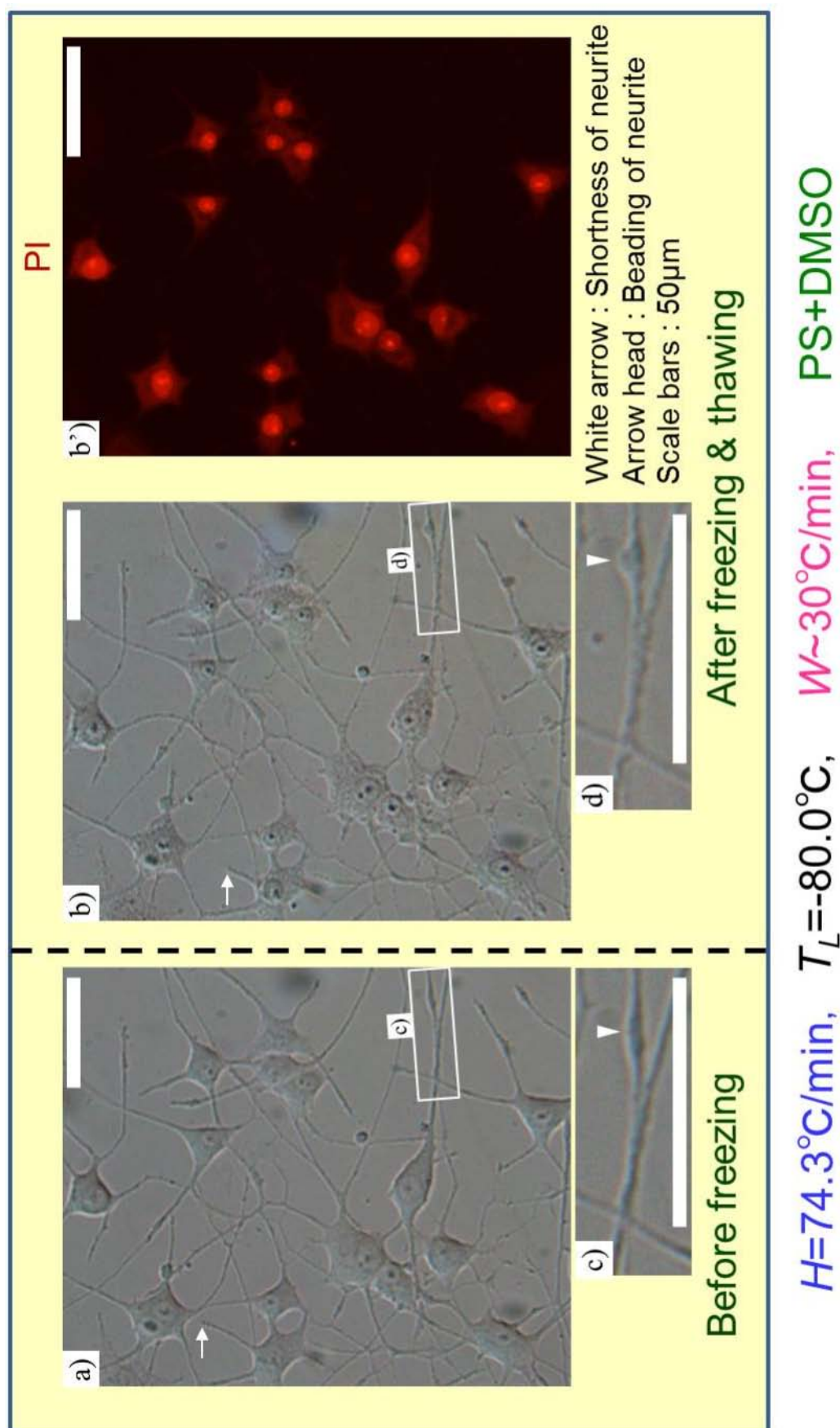


Fig. 4.7 Comparison in cell morphology before freezing and after freezing and thawing, and life and death of post-thaw cells (4)

化と数珠状化)が認められるものの、生理食塩水中の場合の Fig. 3.19 と比較して、大きく減少した。数珠状化は冷却速度に依らず約 40%程度の突起(41~50 突起中)に生じ、短小化する突起の割合(45~59 突起中)は、2%程度であった。冷却速度が速くなるに従って、細胞内凍結による死細胞が増加するため、Figs. 4.4b' と 4.5b' では、赤く染色されない生細胞が 30%程度存在するが、Fig. 4.6b' では 10%程度、Fig. 4.7b' では 0%に減少した。数珠状化は、生細胞と死細胞のどちらにも生じた。細胞体に関しては、生理食塩水中の場合と同様に、輪郭の不明瞭化などの形態変化が生じた。

次に、凍結・融解過程において定点を時系列に観察した結果の代表例として、 $H=0.3$, $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合を Figs. 4.8 と 4.9 に示す。 $H=0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合、拡大した画像中の矢頭で示す突起の部分は、凍結前の Fig. 2a の状態に対して、凍結・融解過程で(Figs. 4.8b~4.8e)ほとんど太さに変化はなく、融解後に数珠状化した(Fig. 4.8f)。 $H=20.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合、Fig. 4.9 中に黒丸で示す 2 つの細胞は、凍結過程で細胞内凍結(暗化)した(Fig. 4.9b)のに対し、白丸で示す 2 つの細胞は凍結・融解過程を通して暗化は見られなかった。それぞれの細胞の突起を拡大した画像中の矢頭で示す突起の部分は、凍結前の Fig. 4.9a の状態に対して、凍結・融解過程で(Figs. 4.9b~4.9e)ほとんど太さに変化はなく、融解後に数珠状化した(Fig. 4.9f)。

形態変化の定量的検討として、凍結・融解前後の突起の太さや長さ、数珠の個数などを計測し、本実験条件の範囲で、以下の特性を得た。

- 1) 凍結・融解後の突起の太さは、明確な冷却速度依存性はなく、数珠状部では平均で約 30%程度太くなり、隣り合う数珠状部の間では平均で約 2%程度細くなった(Fig. 4.10)。生理食塩水中の場合(Fig. 3.27)と比較すると、若干変化が小さい。
- 2) 神経突起長さ $100\mu\text{m}$ 当たりの数珠状部の個数(Fig. 4.11)は、冷却速度にあまり依存せず、平均で 1.5 個程度であり、生理食塩水中の場合(Fig. 3.28)と比較して大幅に減少した。
- 3) 神経突起の凍結前の長さに対する凍結・融解後の長さの割合(Fig. 4.12)は、冷却速度にあまり依存せず、平均で 98%程度となり、この特性も、生理食塩水中の場合(Fig. 3.29)と比較して、変化が大幅に減少した。

Neurofilament L の免疫染色画像の代表例を、位相差画像と共に、Fig. 4.13 に示す。Neurofilament L は、Fig. 3.30 の未凍結状態の場合と同様に神経突起の軸に沿って突起内にはほぼ一様に分布し、Fig. 3.31 の凍結・融解後の突起に生じたような不均一な分布は認められなかった。

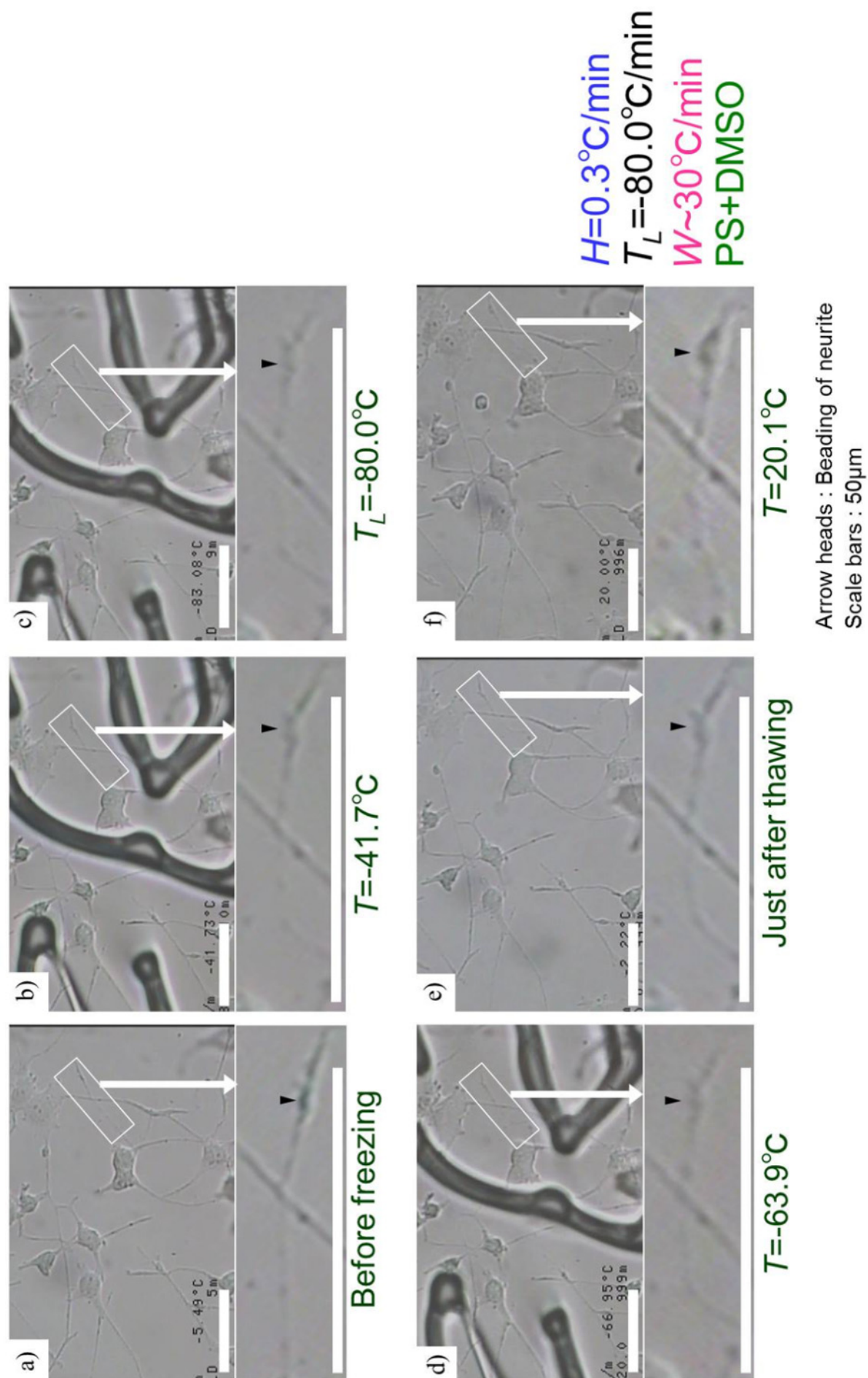


Fig. 4.8 Time-series change in cell morphology during and after freezing and thawing (1)

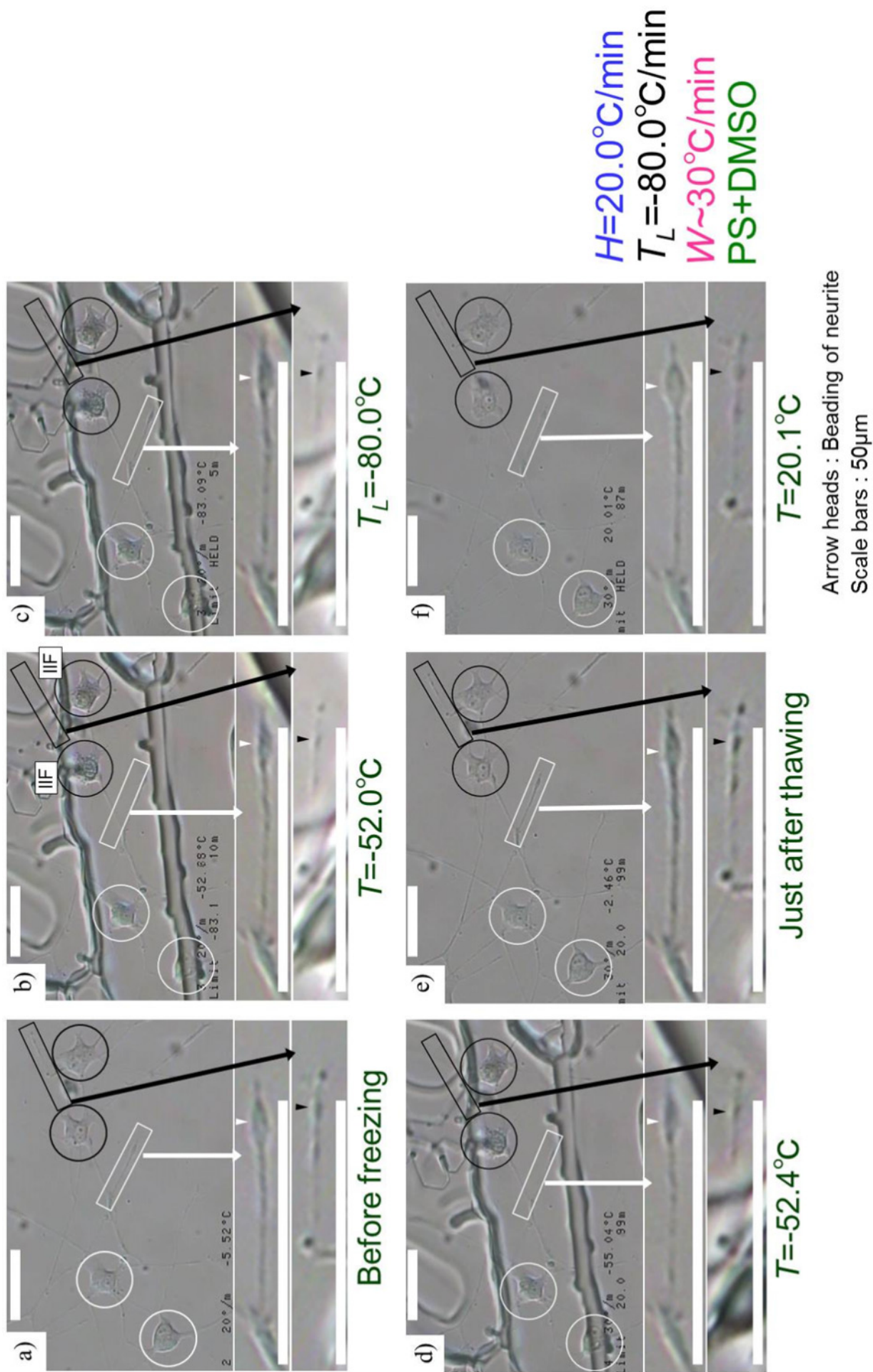


Fig. 4.9 Time-series change in cell morphology during and after freezing and thawing (2)

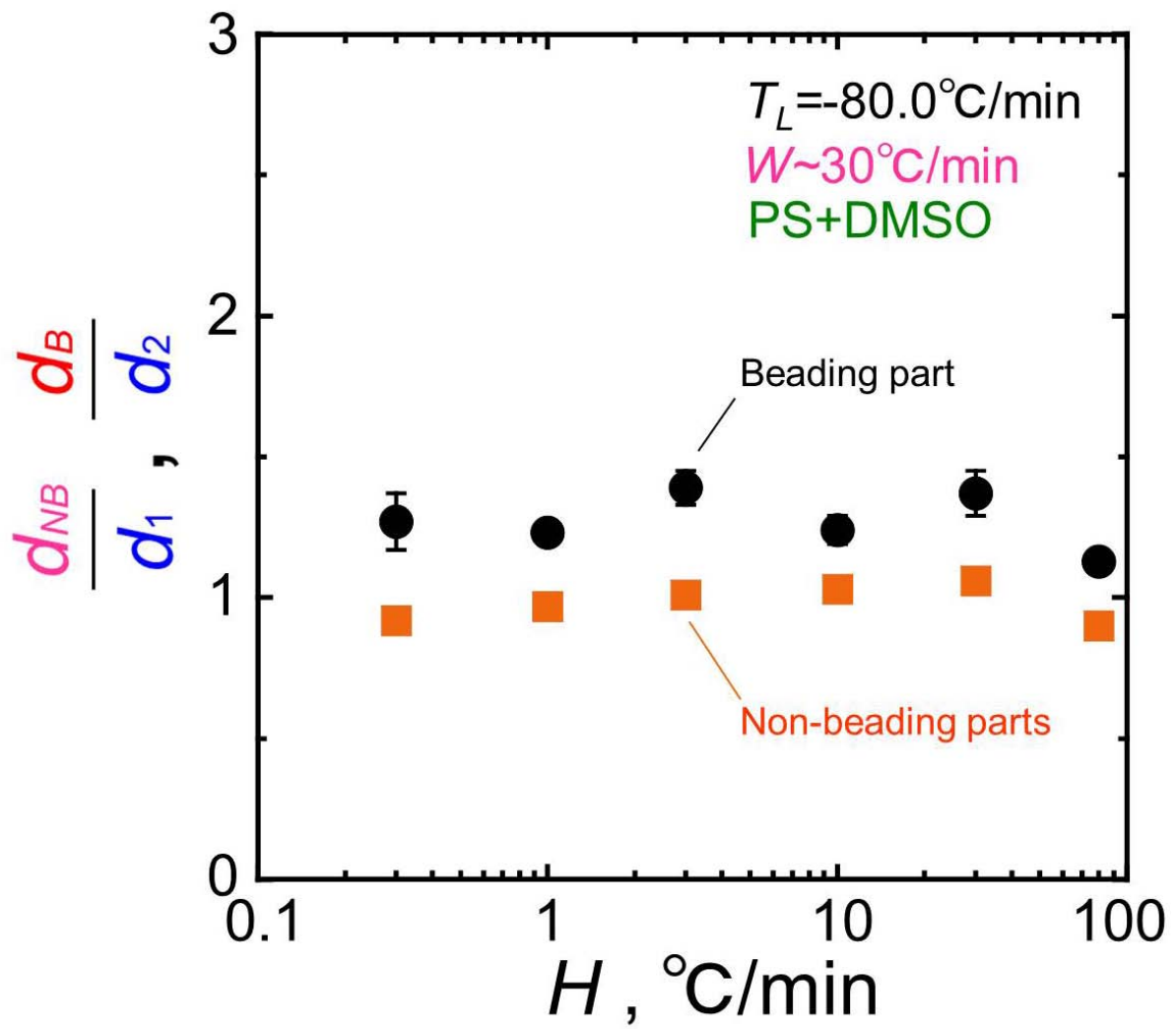


Fig. 4.10 Width of neurites after freezing and thawing against width of neurites before freezing as a function of H

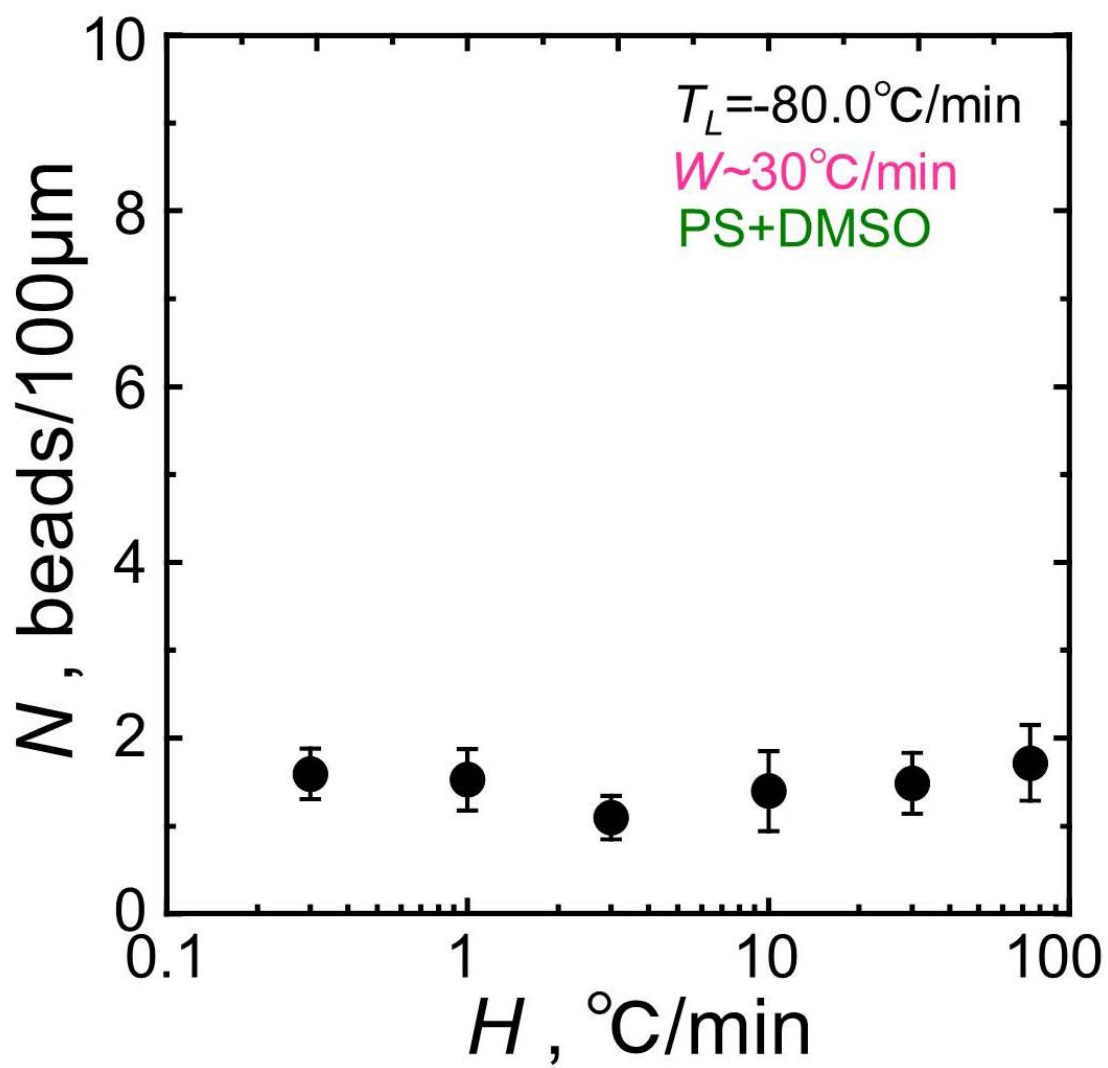


Fig. 4.11 Number of beads per 100 μm of the neurites (N) as a function of H

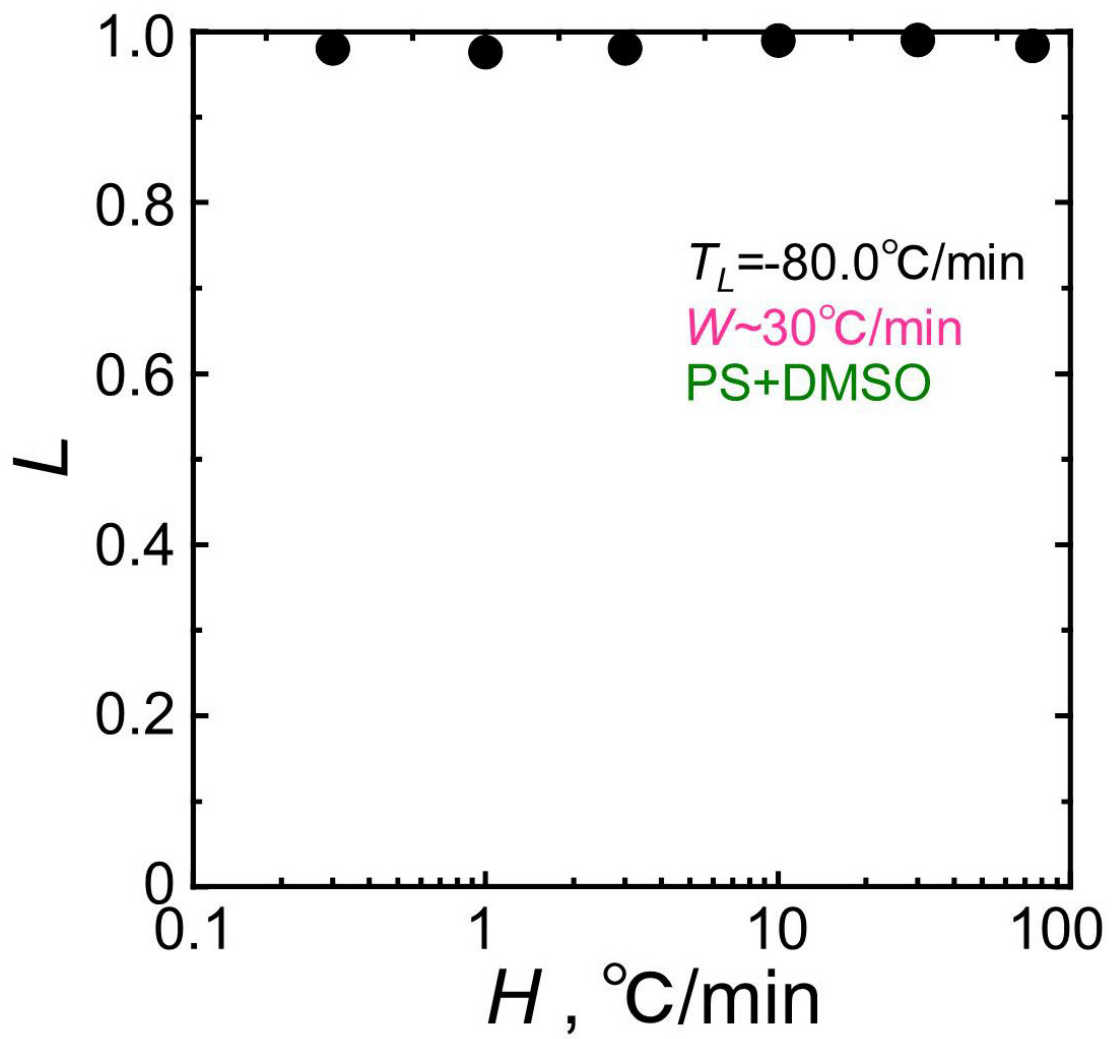


Fig. 4.12 Fraction of neurite length after freezing and thawing against before freezing (L) as a function of H

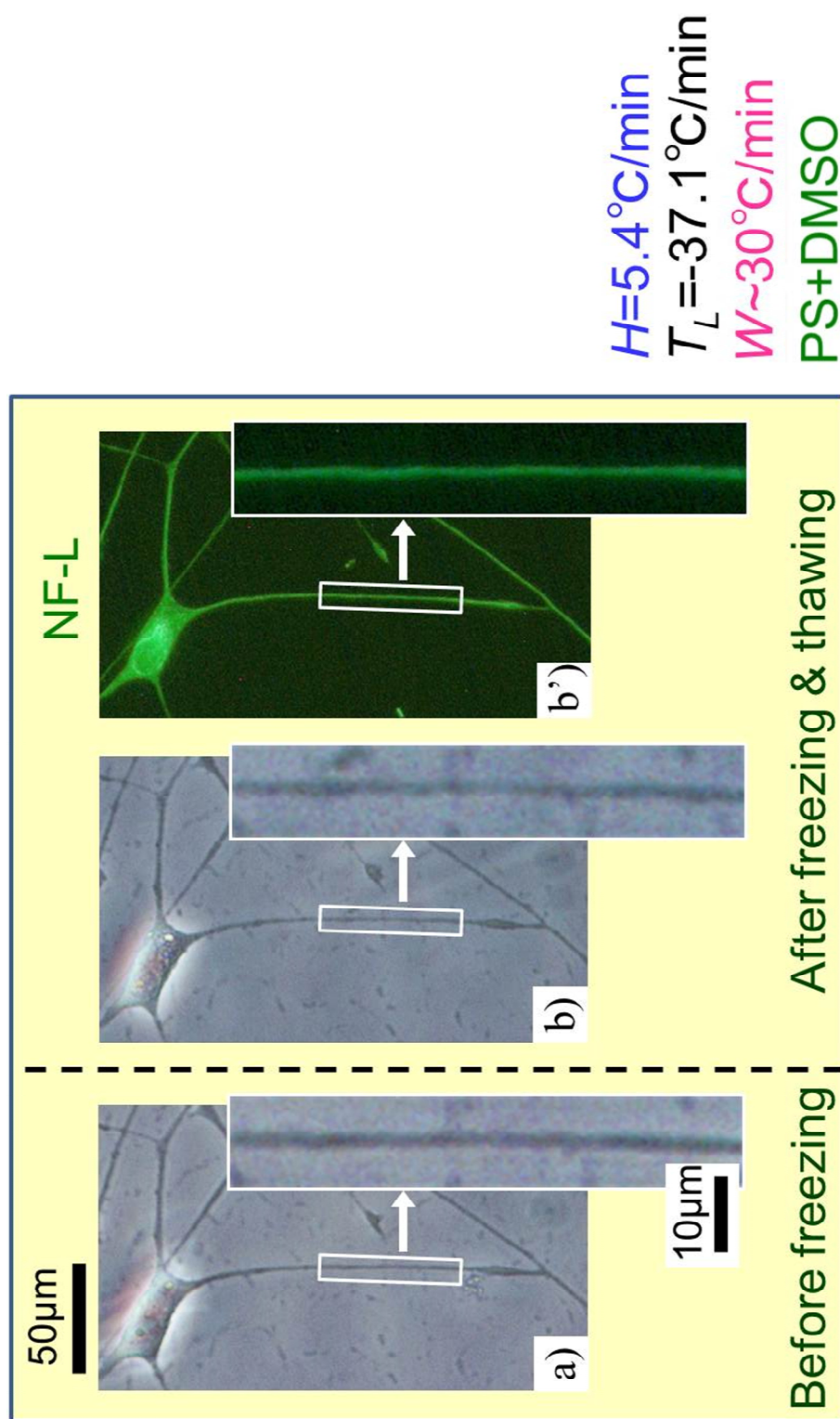


Fig. 4.13 Cells and neurofilament L after freezing and thawing

4.4.3 凍結・融解後の細胞の生存率

凍結・融解後の細胞の生存率の測定結果を Fig. 4.14 に示す．黒丸は細胞回りの水溶液環境が PS+DMSO の場合の分化型 PC12 細胞である．これに対して，水溶液環境を，PS ではなく，より生理的な環境に近い DMEM に置き換えた M+DMSO とし， $H=1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で調べた結果を紫逆三角で示す．また，緑三角は，PS+DMSO で懸濁した未分化型 PC12 細胞であり，赤四角は PS+DMSO の環境下の付着した未分化型 PC12 細胞である．

PS+DMSO の場合の分化型 PC12 細胞は，冷却速度に対して逆 U 字型の生存曲線を描き， $H=0.5\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で極大値をとった ($\eta\sim 0.4$) ．より冷却速度が遅い $H=0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では若干減少し ($\eta\sim 0.35$) ，より冷却速度が速い $H\sim 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では大幅に減少し ($\eta\sim 0.10$) ， $H\sim 75^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で $\eta=0$ となった． $H=1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ における M+DMSO の環境下における生存率は，PS+DMSO の場合とほぼ同様の結果となった．

PS+DMSO の環境下における懸濁状態の未分化型 PC12 細胞の生存率は，本実験条件の範囲では，冷却速度の低下に対して，単調に増加し， $H=0.1\sim 0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ でほぼ一定となった．冷却速度が高い $H\sim 30, 75^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では分化型 PC12 細胞とほぼ同様の生存率となったが，より冷却速度が遅い $H=0.1\sim 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では，基本的に分化型 PC12 細胞よりも生存率が高かった ($p<0.01$) ．付着した未分化型 PC12 細胞も，懸濁状態の場合とほぼ同様の傾向を示し，基本的に分化型 PC12 細胞よりも生存率が高かった ($p<0.01$) ．

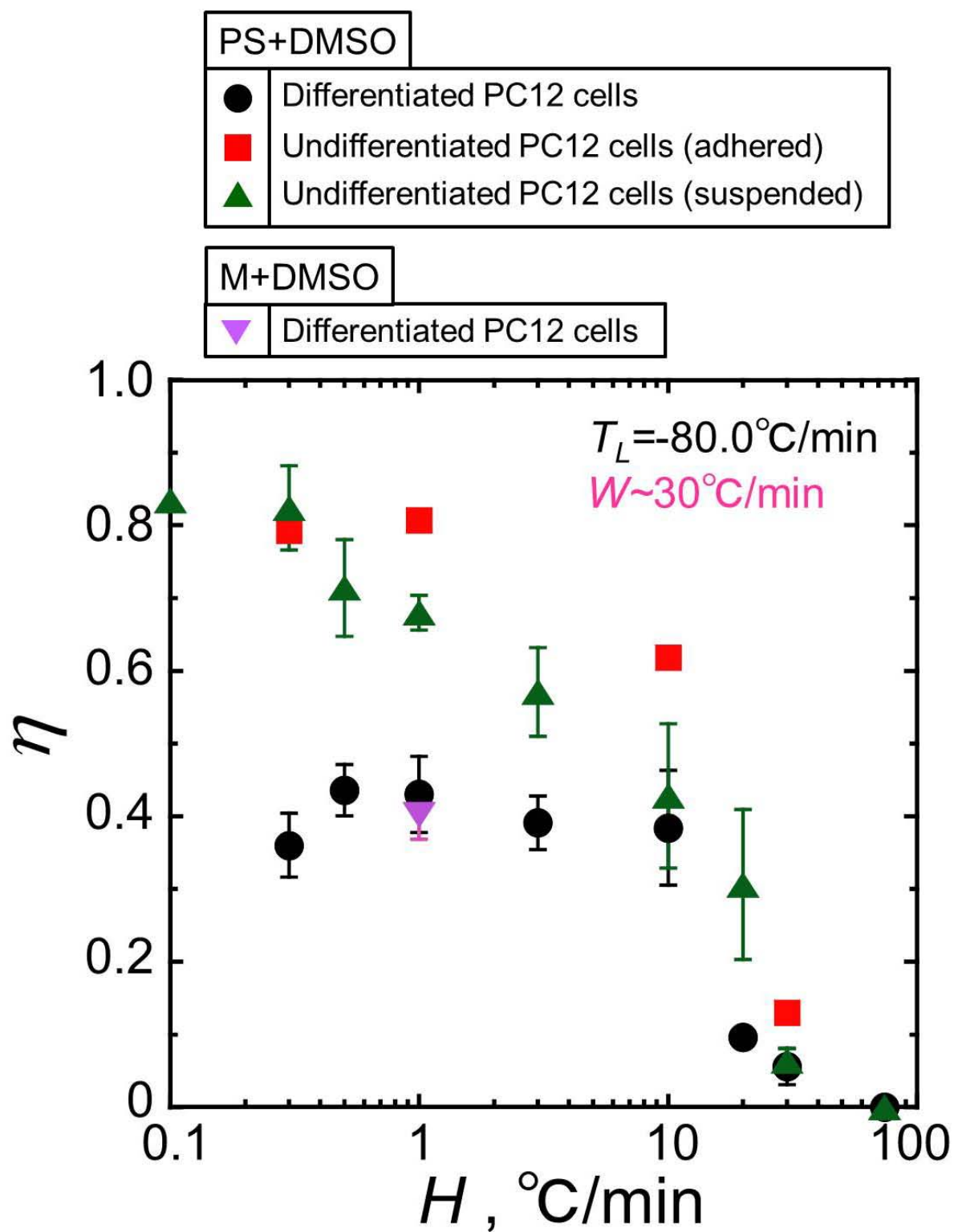


Fig. 4.14 Post-thaw cell viability as a function of H

4.5 考察

4.5.1 凍結挙動と細胞損傷

凍結挙動の観察に関して、細胞外凍結の場合、細胞体の収縮が観察されたが、細胞回りの水溶液環境が PS のみの場合と比較して軽減され、神経突起の湾曲は認められなかった (Fig. 4.1) . これは、DMSO の束一性により溶液の氷点が効果的に下がり、各凍結温度での氷晶形成量が減少し、細胞内外の塩濃度の濃縮が抑えられたことによる^(4,7). このことは、「3.5.1」項で述べた細胞外凍結による細胞損傷がいずれの機序によっていたとしても、その損傷を緩和する効果を持つ. すなわち、塩害説における細胞損傷は、塩濃度が減少するため、軽減される. 最小容積説に関しては、塩濃度の濃縮の抑制によって、細胞内外の浸透圧差が低下し、細胞からの脱水量が減少し、従って損傷原因である細胞の収縮の程度も小さくなるため、損傷が軽減される. 機械的ストレス説に関しては、細胞外の氷晶形成量が減るため、未凍結水溶液量が増加し、その溶液中の細胞密度は減少し、細胞と細胞間、または細胞と氷結晶間の空間が広がるために、損傷が軽減される.

これに対して、冷却速度の増加は細胞内凍結を起こす頻度を増加させるが (Figs. 4.2 と 4.3), 水溶液環境が PS+DMSO の場合では、PS のみの場合と比べて氷が細かく、詳細な挙動は不明である.

4.5.2 凍結・融解後の細胞の形態変化

凍結・融解後の神経突起には、数珠状化や短小化などの形態変化が若干生じるものの、(Figs. 4.4~4.7) 大きく軽減された. 時系列に定点を観察した結果からも、形態変化が、凍結・融解過程から融解後まで、どの段階においてもほとんど生じなかった. さらに、細胞骨格もコントロールと同等の状態であった. これは、「4.5.1」項で述べた DMSO の効果により、細胞外凍結による細胞外氷結晶からの機械的作用が軽減されると共に、溶液効果が抑えられたためと考えられる. 従って、DMSO の添加によって、凍結・融解後の細胞の品質を大きく向上させることが出来たと考えられる.

凍結・融解後の神経突起の形態変化の明確な冷却速度依存性はみられなかった. これは、本実験条件の範囲 ($H < 80$) では、「3.4.1.2」項の結果も考慮に入れると、細胞内凍結によって細胞体内に氷結晶が生じたとしても、神経突起内には及ばないか、及んだとしても限定的であり、神経突起の凍結様式としては概して細胞外凍結のみであるためと考えられる. すなわち、いずれの冷却速度

においても、DMSO の効果によって、細胞外凍結によるストレスが軽減され、形態変化が同様に減少する。

なお、神経突起の形態変化は、細胞の生死にも依存せず大きく軽減されたため、「3.5.4」項で考察したように、細胞の生死との相関性はないと考えられるが、神経突起を介した情報伝達能に対する影響についての検討が望まれる。

4.5.3 凍結・融解後の細胞の生存性

分化型 PC12 細胞は、冷却速度に対して、逆 U 字型の生存曲線を描き、 $H=0.5\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で極大値をとった。これは、より冷却速度が速い $H\geq 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 条件では、細胞内凍結が生じるため、生存率が大きく減少し、より冷却速度が遅い $H=0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では、細胞外凍結による浸透圧ストレスに曝される時間が増大し、生存率が減少するためと考えられる。

分化型 PC12 細胞の生存率は、生理食塩水中の場合 ($T_L\sim -11^{\circ}\text{C}$ で $\eta\sim 0$) と比較して、大幅に上昇した。これは、形態変化と同様に、「4.5.1」項で述べた DMSO の効果により、損傷が抑えられたためと考えられる。

DMSO の添加によって生存率が上昇したが、 $\eta\sim 0.4$ であり、まだ改善の余地が大きい。PS を分化誘導時の培養液に置き換えた場合 (M+DMSO) の生存率は、PS+DMSO の場合とほとんど差が無かったが、これは、分化誘導時の培養液中の血清濃度 (0.1v/v%) が低かったためかもしれない。Grilli らは、マウスの骨髄細胞の細胞懸濁液に凍結保護物質として DMSO に加え、更に 1)10v/v% マウス血清または 2)10v/v% ウシ胎児血清を加えた場合と、3)血清を加えない場合について緩速凍結保存後の有核細胞数とそのコロニー形成率を比較した^(4,8)。その結果、それぞれ、1)59.7%有核細胞、100.5%コロニー形成率、2)59.8%有核細胞、34.7%コロニー形成率、3)24.5%有核細胞、18.2%コロニー形成率となった。従って、血清に凍結保護効果があり、同種由来の方が効果が高いことが示された。分化型 PC12 細胞の場合も、血清濃度の上昇や、同種の血清を用いることにより、さらに生存率を上昇させられる可能性がある。また、生存率を上昇させるための別の方法としてガラス化による保存も考えられ、今後の検討が望まれる。

4.5.4 未分化型 PC12 細胞の凍結・融解後の生存性との比較

分化型 PC12 細胞は、未分化型 PC12 細胞よりも、比較的低冷却速度において生存率が低かった。従って、PC12 細胞は分化することにより凍結耐性が低くなるため、分化型 PC12 細胞の凍結保存では、基本的に、より高度な技術が必要であると考えられる。

未分化型 PC12 細胞は、比較的高冷却速度の領域で、接着状態の方が、懸濁状態よりも生存率が高い傾向がある。一方、Choi らは、ヒト皮膚線維芽細胞を用いた凍結実験を行い、懸濁状態と比較して、接着状態の方が、比較的高冷却速度における細胞内凍結が起こりやすく、凍結・融解後の生存率が低いことを示した^(4.9)。PC12 細胞の場合は、繊維芽細胞とは細胞の特性が異なり、接着状態の方が懸濁状態よりも細胞内凍結が起こりにくい可能性がある。

4.5.5 神経ネットワークの凍結保存後の生存性に関する従来の研究との比較

Ma らは、*in vitro* で神経ネットワークを形成した初代神経細胞に対する凍結保存において、細胞のコラーゲンゲル中への包埋により、細胞膜の色素排斥能の点から生存性が向上することを示した^(4.1)。同様の実験系で、Malpique ら^(4.10)は、材料として神経様細胞へ分化誘導したマウス神経芽細胞腫由来細胞株(N2a 細胞)を用い、アルギン酸塩ゲルに包埋する場合の方が、コントロールよりも細胞内酵素活性に基づく生存性が3倍程度上昇することを示した。従って、分化型 PC12 細胞の場合でも、このような高分子ゲルに包埋することで生存率が上昇する可能性があるが、ゲルに包埋した場合でもまだ生存率が比較的低く(6~7割程度)、改善の余地が大きい。

また、Pichugin らは、海馬組織の切片に対して、氷結晶を伴わないガラス状態で固化させるガラス化保存を行い、切片全体から抽出した K^+ と Na^+ の濃度比を生存性の指標として評価した場合、通常の凍結保存に比べその生存性が向上し、コントロールの90%以上まで達することを示した^(4.11)。海馬組織の切片中には、神経細胞以外にもグリア細胞や血管の細胞も多く存在し、当該研究では、それらの細胞を全て合わせた生存率を求めている。従って、神経細胞のみの生存率は不明であるが、基本的には通常の凍結保存と比べ上昇していると考えられ、分化型 PC12 細胞においてもガラス化保存の検討が望まれる。

4.6 まとめ

前章で調べた生理食塩水中の神経様細胞の凍結・融解特性に対する凍結保護物質の効果を調べるため、細胞膜透過型凍結保護物質である DMSO (10v/v%) を添加した水溶液中の神経様細胞に対して、凍結挙動を調べると共に、凍結・融解後の形態変化と生存性を調べた。まとめは以下のとおりである。

- 1) 凍結様式の冷却速度依存性は、生理食塩水中の場合と定性的には同様であるが、細胞外凍結による細胞体の脱水・収縮・変形が軽減される。これは、DMSO の効果により、各凍結温度での氷晶形成量が減り、細胞外氷結晶からの機械的作用や、細胞内外の塩濃度の濃縮が抑えられるためである。
- 2) 凍結・融解後の神経突起の形態変化は、生理食塩水中の場合と比較して大きく軽減される。短小化はほとんど生じず、数珠状化は 4 割程度の突起で発生するが単位長さ当たりの個数は非常に少ない。神経突起の細胞骨格に関しても、中間径フィラメントは、生理食塩水中の場合と比較してその変化が大幅に減少する。これらの変化の明確な冷却速度依存性はみられないが、これは、本実験条件の範囲内では、細胞内凍結する場合でも、氷結晶は細胞体内に留まり、神経突起まではほとんど及ばないためと考えられる。
- 3) 凍結・融解後の細胞の生存率は、生理食塩水中の場合と比較して、大幅に上昇し、 $\eta \sim 0.4$ まで到達する。冷却速度に対しては、逆 U 字型の曲線を描くが、これは、より冷却速度が速い条件では、細胞内凍結による細胞死が増加し、より冷却速度が遅い条件では、細胞外凍結による浸透圧ストレスの影響が増大するためと考えられる。
- 4) 分化型 PC12 細胞の凍結・融解後の生存率は、未分化型 PC12 細胞と比較して低い。従って、基本的に、PC12 細胞は分化することにより凍結耐性が低くなるため、分化型 PC12 細胞の凍結保存にはより高度な技術が求められると考えられる。

第 5 章

結 論

本論文では、創薬分野において応用上必要な、神経突起を有する神経細胞の凍結に関する基礎的特性を理解するため、基質に付着した神経様細胞に対する凍結実験を行った。以下に結論を述べる。

1) 第1章では、本研究の背景と目的について論じた。神経ネットワークを形成した細胞や組織を、そのままの状態凍結保存が出来れば、神経細胞を用いた薬剤スクリーニングの大幅な効率化が実現できると考えられるが、このような研究は、まだ少なく、未解明な点が多い。また、当該細胞は、細胞体から多数の細長い神経突起が伸びるという特徴的な形態を持つため、形態学的な基礎的観点からも興味深い。そこで、本研究では、神経突起を有する神経細胞の凍結に関する基礎的特性を理解することを目的とし、基質に付着した神経様細胞（分化型 PC12 細胞）に対する凍結実験を行うこととした。

2) 第2章では、まず、実験材料である分化型 PC12 細胞を効率的かつ安定的に準備するため、PC12 細胞の増殖・分化特性を実験的に調べた。本研究の範囲内では、未分化型 PC12 細胞の安定な増殖と分化は、低血清濃度では実現しないが、高血清濃度では実現し、その定量的特性を調べ、分化率が最も高くなる条件を明らかにした。

次いで、実験結果の現象論的検討に基づいて、未分化細胞の増殖と分化における細胞数の時系列変化の反応速度論的定式化による数学モデルを展開し、基礎方程式とその解析解を求めると共に、速度定数であるモデル定数のパラメータスタディにより、モデル特性を詳細に明らかにした。

さらに、本モデルと PC12 細胞の実験結果に基づいた逆問題解析からモデル定数を決定し、計算値が実験値の特性を良く模擬できることより、モデルの妥当性を示した。本モデルで定義・提案した細胞の増殖・分化の速度定数は、細胞固有の特性値として見なせ、本モデルを通して、細胞の増殖・分化特性を数学的に記述できる。

3) 第3章では、第2章の結果に基づいて準備した分化型 PC12 細胞に対して、まずは生理食塩水中において、凍結挙動を調べると共に、凍結・融解後の形態変化とそれに及ぼす浸透圧ストレスの影響を調べ、さらに凍結・融解後の生存性を調べた。

凍結様式は、他の一般的な細胞と同様に、冷却速度が低い場合には細胞外凍結であり、冷却速度の増加に従って、細胞内凍結の発生頻度が増加する。細胞外凍結では、細胞体と神経突起は、共に脱水・収縮・変形する。細胞内凍結は、

細胞体で優先的に起こり、細胞内を伝播し、冷却速度の増加に対して、神経突起の根元から先端に向かう離れた位置まで氷結晶が及ぶ。

凍結・融解後の細胞には、神経突起の数珠状化や短小化、細胞体の輪郭の不明瞭化などの形態変化が生じ、最低到達温度の低下に対して助長される傾向を示す。この神経突起の形態変化は、細胞の生死を問わず生じるため、致命的な損傷ではないが、この変化に対応して、神経突起の細胞骨格に関しても、中間径フィラメントの神経突起内の分布に同様の変化が生じる。また、同様の形態変化は、塩化ナトリウムの等張から高張を経て等張へ戻る濃度変化に対しても生じるため、浸透圧ストレスが凍結・融解後の細胞の形態変化に大きな影響を及ぼすと考えられる。

凍結・融解後の細胞の生存率については、最低到達温度の低下と共に単調減少する。本実験では、生存率が変化する比較的高い温度範囲に注目しているため、凍結様式は主に細胞外凍結である。従って、凍結様式の違いに起因するような影響がないため、本実験条件の範囲内では、細胞の形態変化や生存率の冷却速度依存性が小さい。

- 4) 第4章では、3章の検討で明らかにした凍結・融解特性に対する凍結保護物質の効果を明らかにするため、DMSOを添加した生理食塩水中の分化型PC12細胞に対して、上記と同様の検討を行った。

凍結・融解後の細胞の神経突起の数珠状化や短小化は、生理食塩水中の場合と比較して大きく軽減される。神経突起の細胞骨格に関しても、神経突起内の中間径フィラメントは、生理食塩水中の場合と比較して均一に分布し、未凍結状態の場合とほぼ同等の状態を示す。さらに、生存率も、生理食塩水中の場合と比較して大幅に上昇する。これは、DMSOの効果により、細胞外凍結による溶液効果や細胞外氷結晶からの機械的ストレスが軽減されたためと考えられる。

生存率は冷却速度に対して逆U字型の曲線を描くが、神経突起の形態変化の明確な冷却速度依存性は認められない。これは、本研究の範囲内では、細胞内凍結する場合でも、氷結晶は神経突起までほとんど及ばないためと考えられる。

以下に今後の課題について述べる。

- 1) 本研究で展開した細胞の増殖・分化の数学モデルは、細胞の増殖・分化のプ

ロセス設計や予測などへの利用が期待されるが、より幅広い条件下の増殖・分化プロセスに適用するためには、様々な環境因子に対するモデル定数の依存性を詳細に解明する必要がある。

- 2) 凍結・融解後の分化型 PC12 細胞の形態変化や死滅は、DMSO の添加によって、生理食塩水のみの場合と比較して軽減するが、細胞の高分子ゲルへの包埋やガラス化保存の適用などにより、形態変化や生存率がさらに改善される可能性がある。
- 3) 凍結・融解後の神経突起には特徴的な形態変化が生じ、この変化は DMSO の添加によって大幅に軽減される。この形態変化が、神経突起の特徴的な機能である情報伝達能に及ぼす影響を調べ、凍結保護物質によってどの程度改善されるかを明らかにすることは、薬剤スクリーニングへの応用の観点から重要である。
- 4) 神経突起の形態変化の詳細な形成メカニズムについては良く分かっていない。このメカニズムが解明されれば、より確実かつ効果的に、神経突起に対する損傷を抑制する方法の開発につながる可能性がある。

付 録

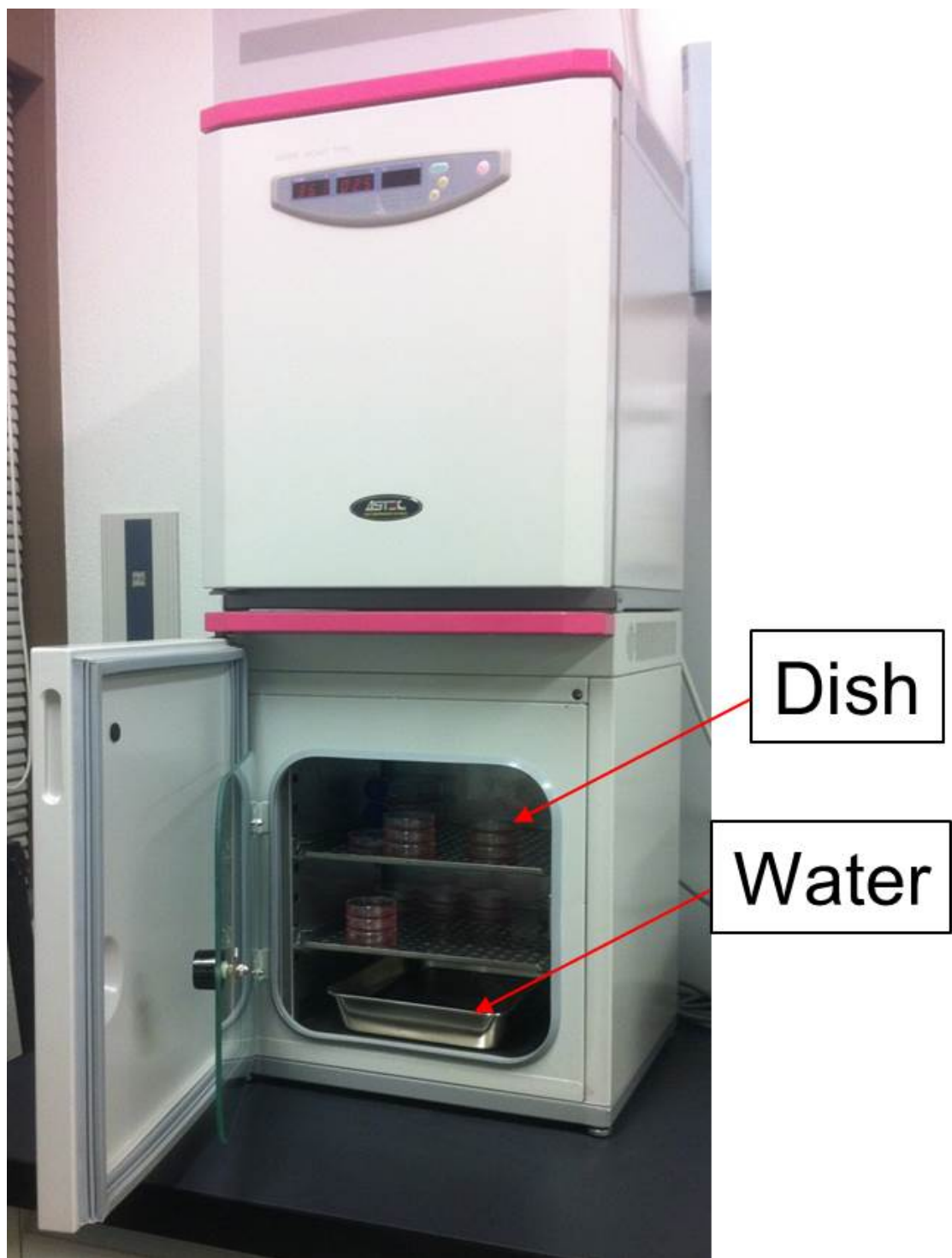
A. 細胞培養に関する主な装置

細胞を培養するには、体内と同じ環境に置くことが重要であり、細胞は恒温装置（インキュベータ）内で培地ごと 37°C に維持しながら培養する。細胞を培う培地の pH は、重炭酸バッファーで緩衝されており、気層の CO₂ 濃度を一定に保つことに依り、適当な pH に維持することが可能であり、そのような機能をもったインキュベータを、CO₂ インキュベータと呼ぶ。空気中の CO₂ 濃度はほとんど 0% に近く、そのままでは培地から CO₂ ガスが逃げ、培地の pH はアルカリ性に傾いてしまう。通常は、95% 空気、5% CO₂ の気層の時、培地の pH が 7.4 に保たれるが、細胞によっては 3~10% CO₂ の間で変更される場合がある。本研究で使用了 PC12 細胞は、CO₂ インキュベータ（APC-30D, アステック社製, 日本）（App.-fig. 1）を用い、37°C, 10% CO₂ 環境下で培養した。

細胞を扱う作業は無菌状態で行う必要があるため、基本的にクリーンベンチ（MHE-130AJ, 三洋電機バイオメディカ社製, 日本）（App.-fig. 2）内で行った。上または奥の壁から手前に向かって無菌空気が吹き出し、作業者の手前で吸い込まれることにより、無菌作業する空間が作られる。空気は、孔径 0.22μm のメンブレンフィルターを通して除菌している。

細胞の洗浄や、細胞外液の交換のためには、細胞と細胞外液を分離させる必要がある。そのため、懸濁液を遠沈管（Thermo Fisher Scientific 社製, アメリカ）へ移し、遠心機（5100, 久保田製作所社製, 日本）（App.-fig. 3）を用いて遠心した。通常、細胞の遠心は、相対遠心力が約 200×g 程度で行うが、本研究では、細胞に対するダメージを極力少なくするため、約 120×g 程度で行った。

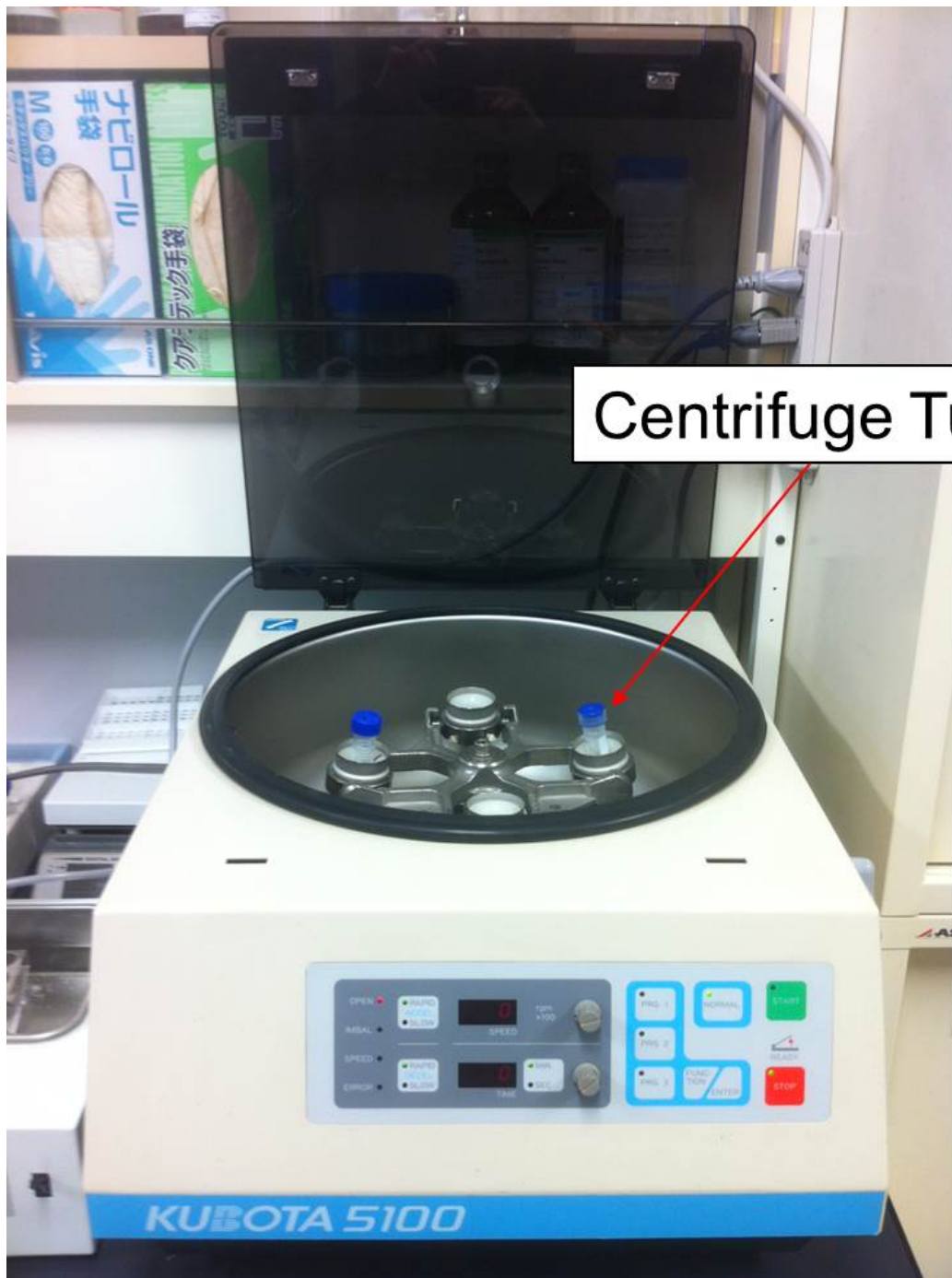
また、培養に関する廃棄物は、バイオハザードを考慮し、オートクレーブ（KT-2346, アルプ社製, 日本）（App.-fig. 4）による滅菌（120°C, 2 気圧, 20 分）後に廃棄した。



App.-fig. 1 Outlook of CO₂ incubator (APC-30D)



App.-fig. 2 Outlook of clean bench (MHE-130AJ)



App.-fig. 3 Outlook of centrifuge (KUBOTA5100)



App.-fig. 4 Outlook of autoclave (KT-2346)

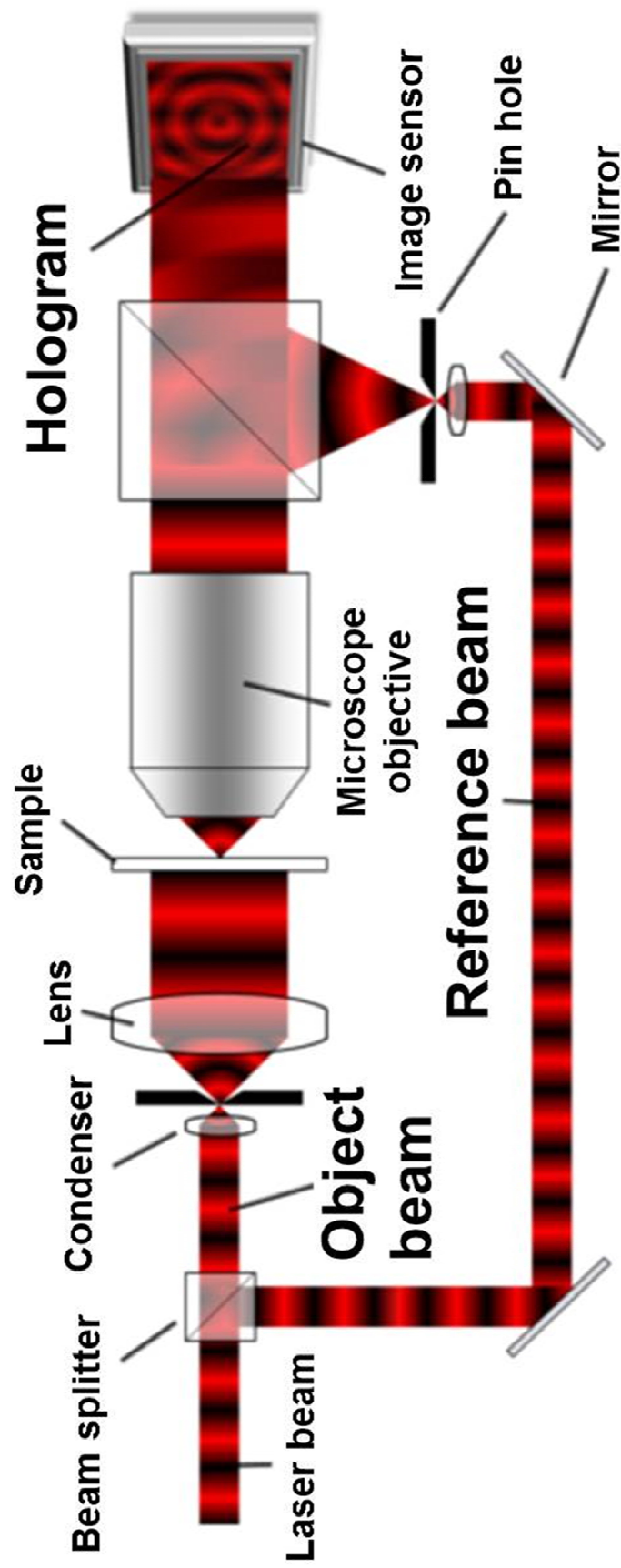
B. ホログラフィー顕微鏡

デジタルホログラフィー顕微鏡 (App.-fig. 5) によって、ホログラフィーの位相差情報から、細胞の厚さ情報などが得られ、3 次元的な形態を時系列で観察することができる。本研究では、実験材料の PC12 細胞の厚さの測定に本顕微鏡を使用した。

デジタルホログラフィー顕微鏡による観察・撮影の原理を App.-fig. 6 に示す。ビームスプリッターで 2 分されたレーザ光は一方は物体光、もう一方は参照光となる。物体光は物体を透過し対物レンズを通して参照光と干渉する。それによってできた干渉縞に参照光をもう一度あててすることで参照光は回折され物体光が再生される。物体光と参照光の位相のずれから得られる高さ（細胞の厚さ）情報により 3 次元的な形態を得ることができる。



App.-fig. 5 Outlook of holographic microscope (HoloMonitor M3)



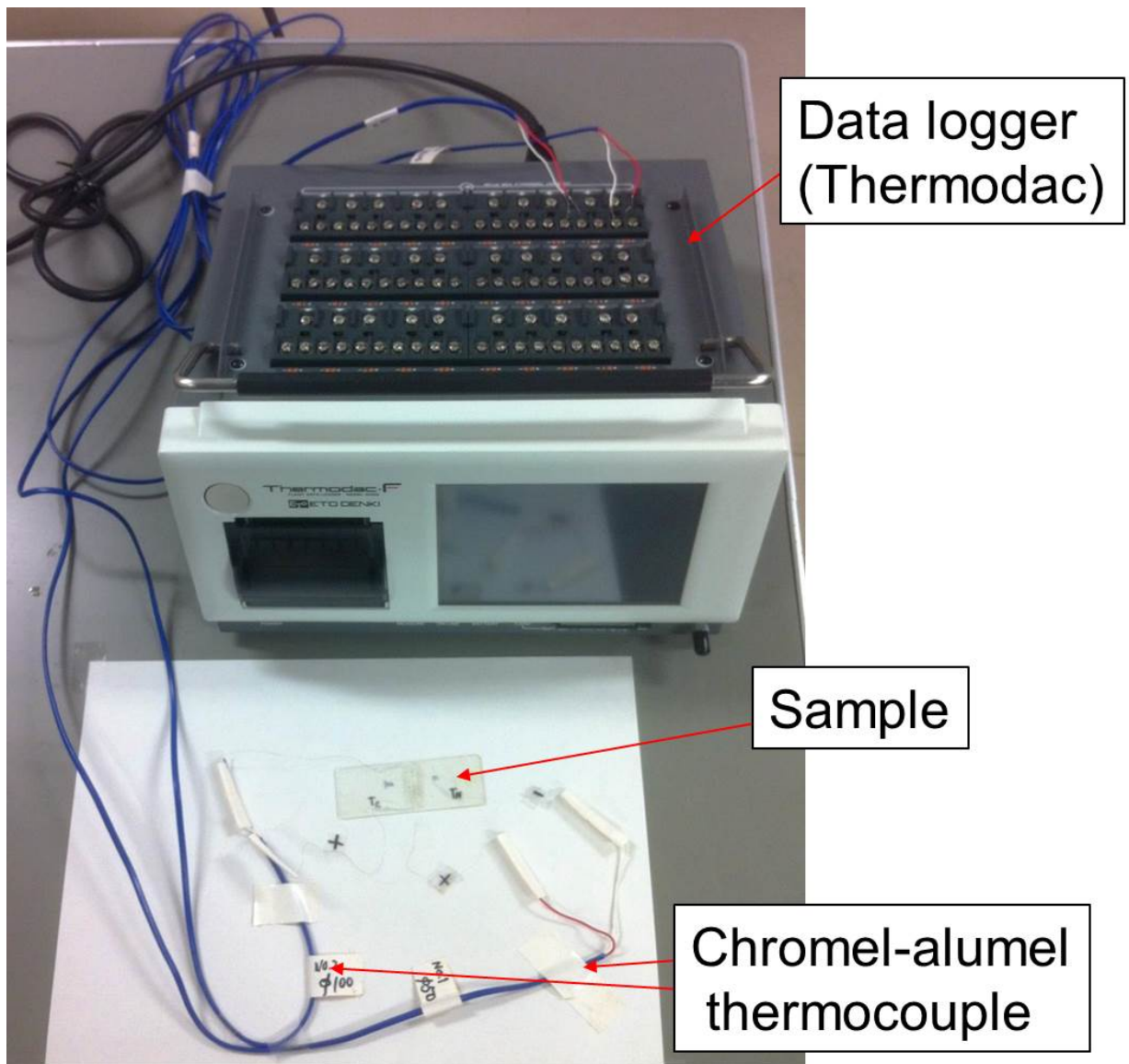
App.-fig. 6 Principle of holographic microscopy (Phase Holographic Imaging AB)

C. 温度校正の詳細

App.-fig. 7 に温度測定の実験系の外観を示す. App.-fig. 8 は, 方向性凝固ステージ上での温度測定のための試料の外観と概略図である. 2 本の熱電対をアロンアルファでマイクロスライドに接着させ, ステージとマイクロスライドの間には微量のエタノールを注入した. App.-fig. 9 は, 一様温度分布ステージ上での温度測定のための試料の外観と概略図である. まず, PCS と GCS をアロンアルファで接着させた後, 2 本の熱電対をアロンアルファで PCS に接着させた. 更に, 熱電対をよりはがれにくくするため, 熱電対と PCS の全体をグリースで覆った. ステージと GCS の間はグリースで接着させた.

方向性凝固ステージ上で静止した試料の設定最低到達温度 (T_{Ls}) と熱電対によって計測した最低到達温度 (T_{Ltc}) の関係を App.-fig. 10 に示す. また, 移動し冷却・加温される試料の位置 (ステージの高温側ブロックの端を基準とし, 高温側を正とする) と熱電対によって計測した温度 (T_{tc}) の関係を, 凍結挙動の観察に用いる条件については App.-fig. 11 に示し, 形態変化と生存率の測定に用いる条件については, App.-figs. 12~17 に示す. App.-figs. 12~17 では, 設定高温側温度 (T_{Hs}), T_{Ls} , 設定温度勾配 (G_s), 熱電対によって計測した温度勾配 (G_{tc}), 試料の移動速度 (V), 熱電対によって計測した冷却速度 (H_{tc}) の数値表も示す. G_{tc} はグラフ内に示した赤直線の勾配とした.

一様温度分布ステージ上の試料の, T_{Ls} と T_{Ltc} の関係 App.-fig. 18 に示す. また, 冷却・加温過程の T_{tc} の時間変化の結果を App.-figs. 19~21 に示す. App.-figs. 19~21 では, UTDS のセンサーによる表示温度と設定温度 (T_s) も示す. H_{tc} はグラフ内に示した赤直線の勾配とした. さらに, 熱電対によって計測した冷却速度 (H_{tc}) と設定冷却速度 (H_s) との関係を App.-fig. 22 に示す.



App.-fig. 7 Outlook of system for measuring temperature of sample

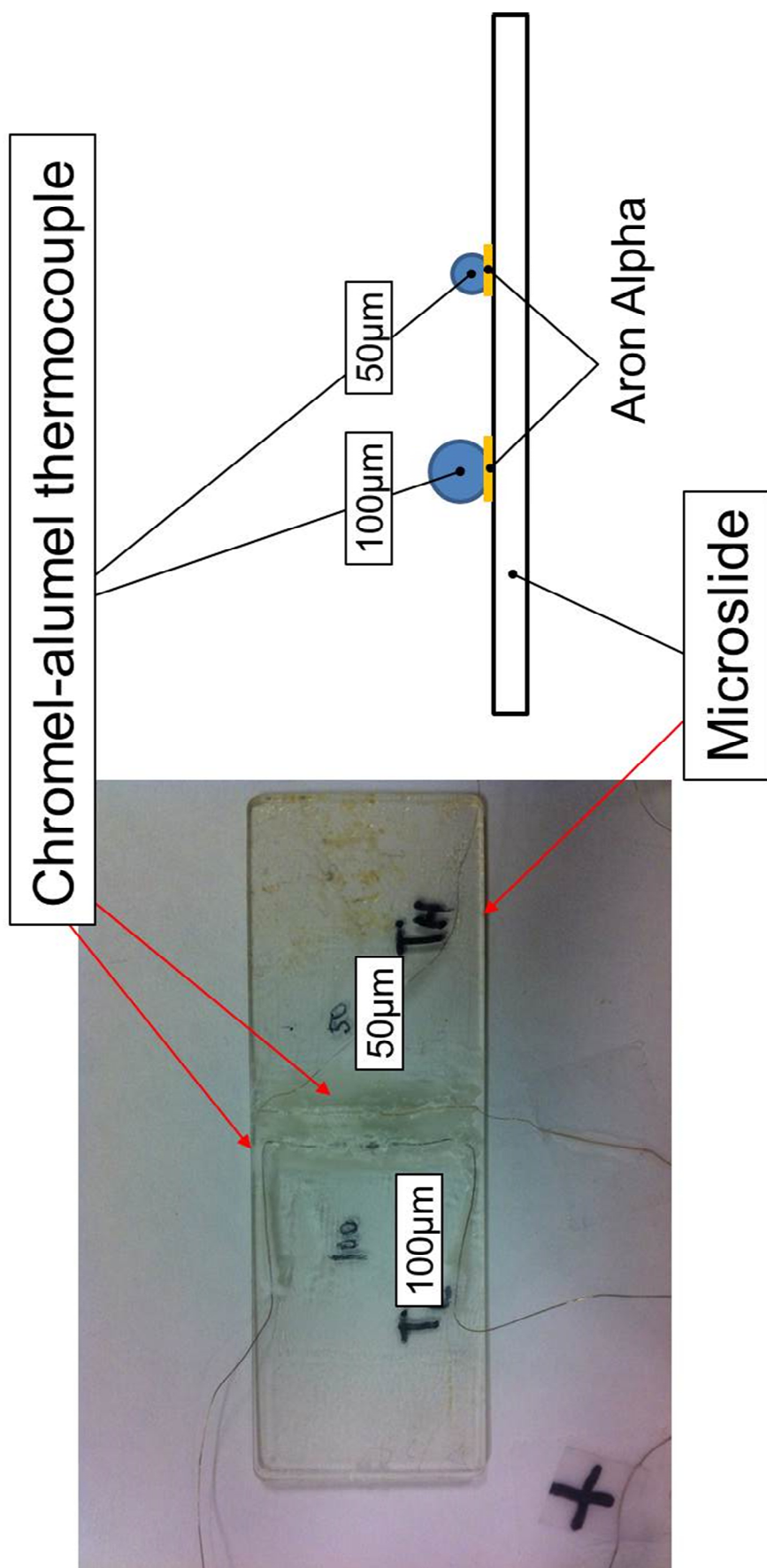


Fig. app8 Outlook of system for measuring temperature of sample

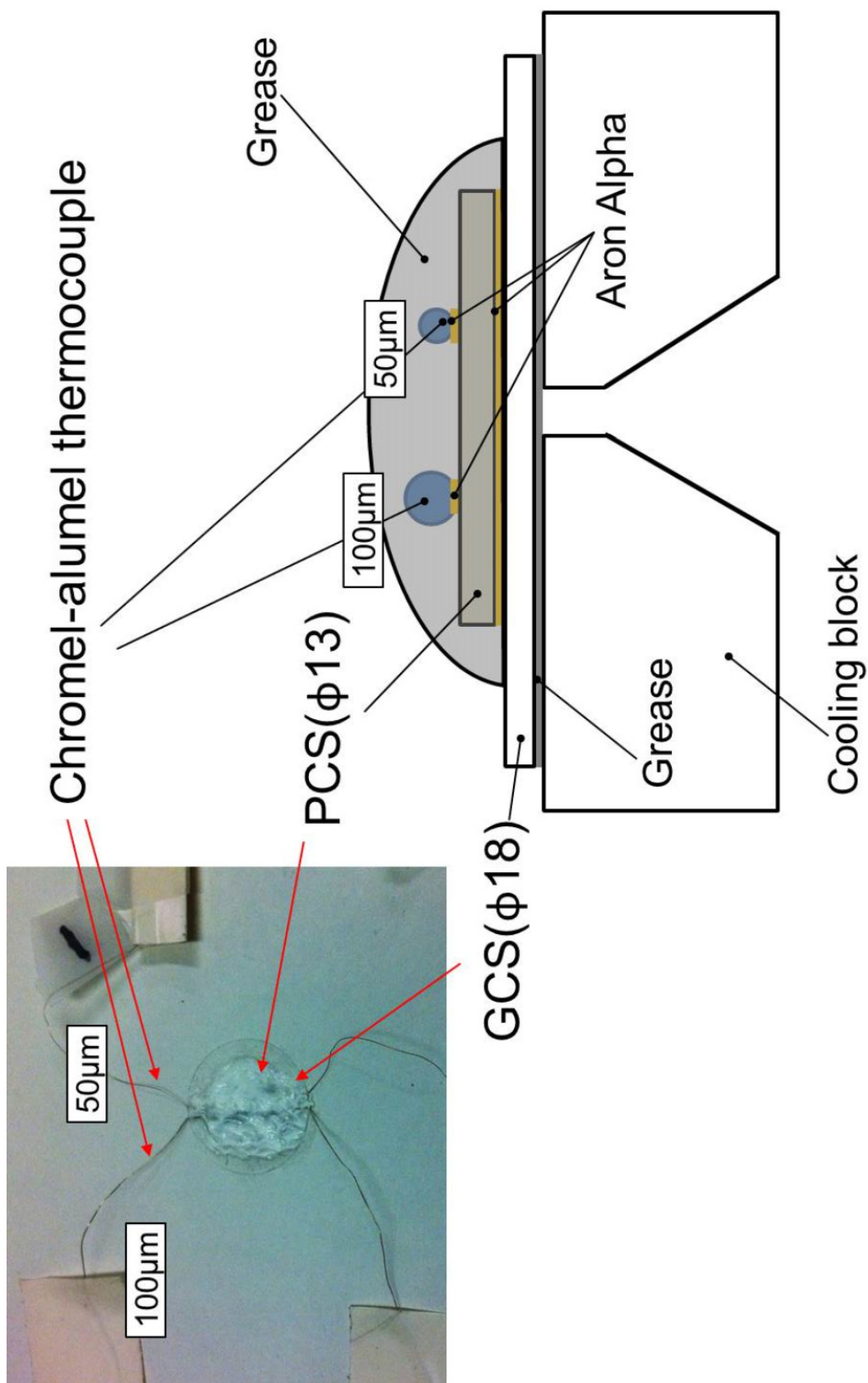
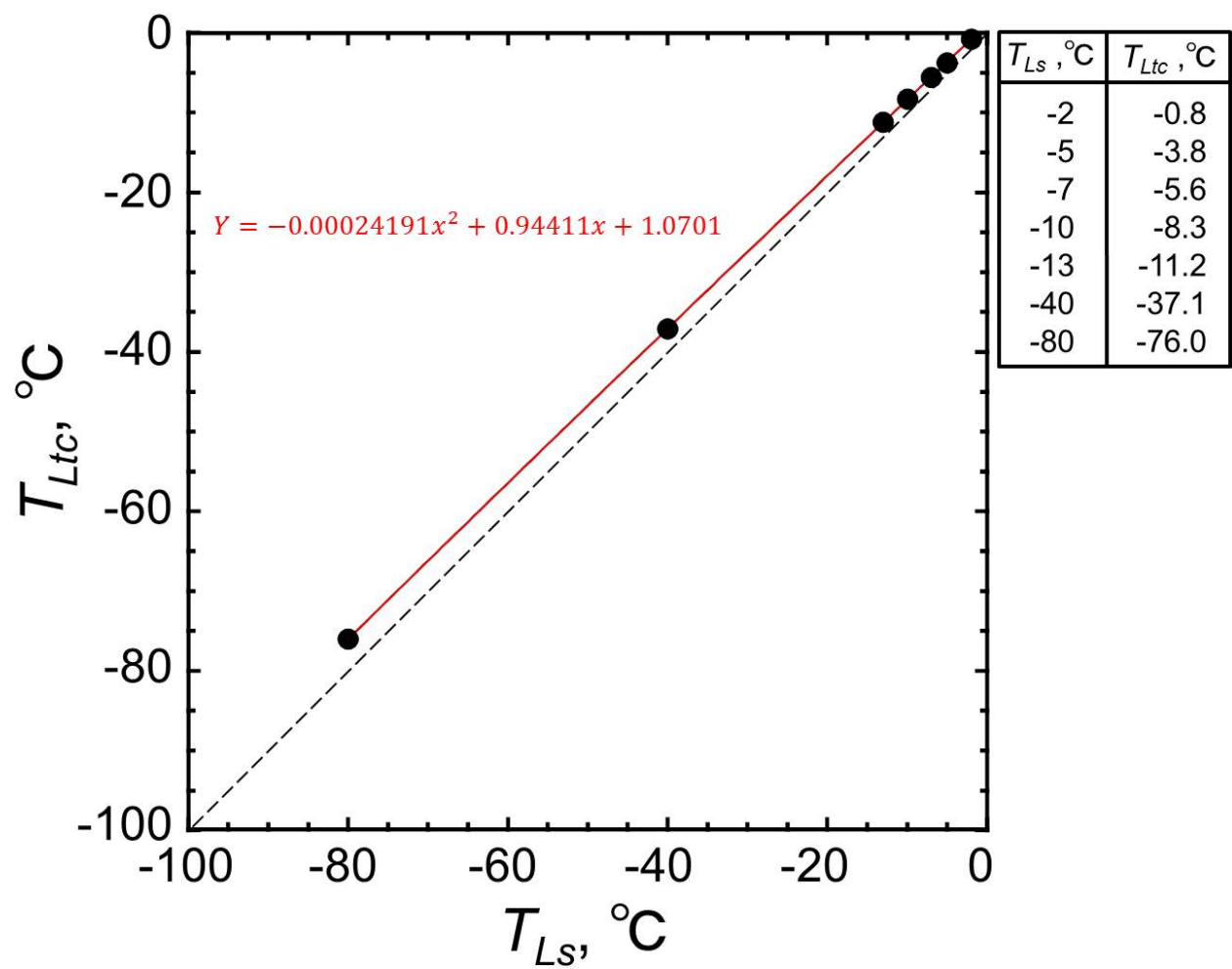
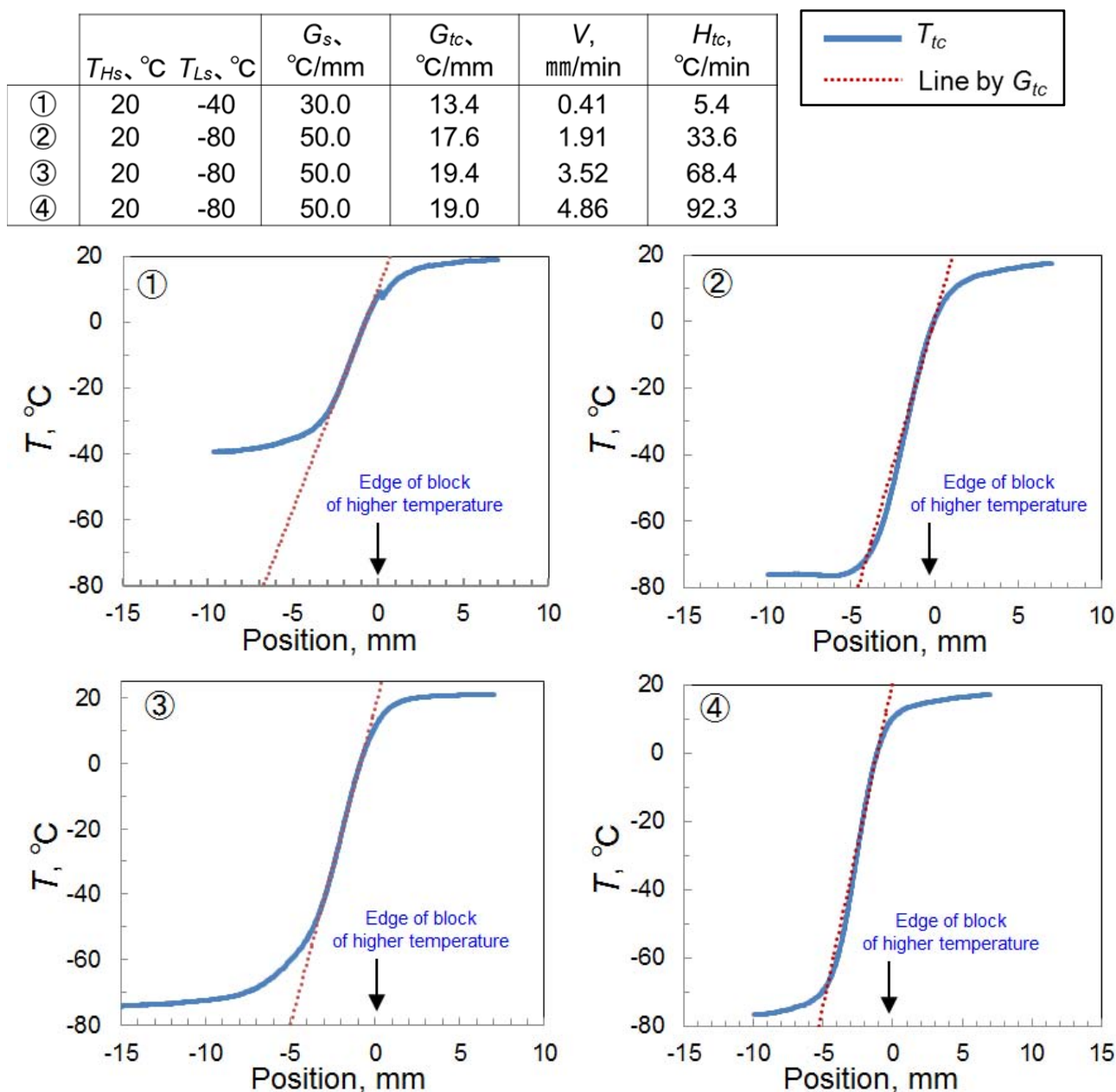


Fig. app9 Outlook of sample for measuring temperature on UTDS



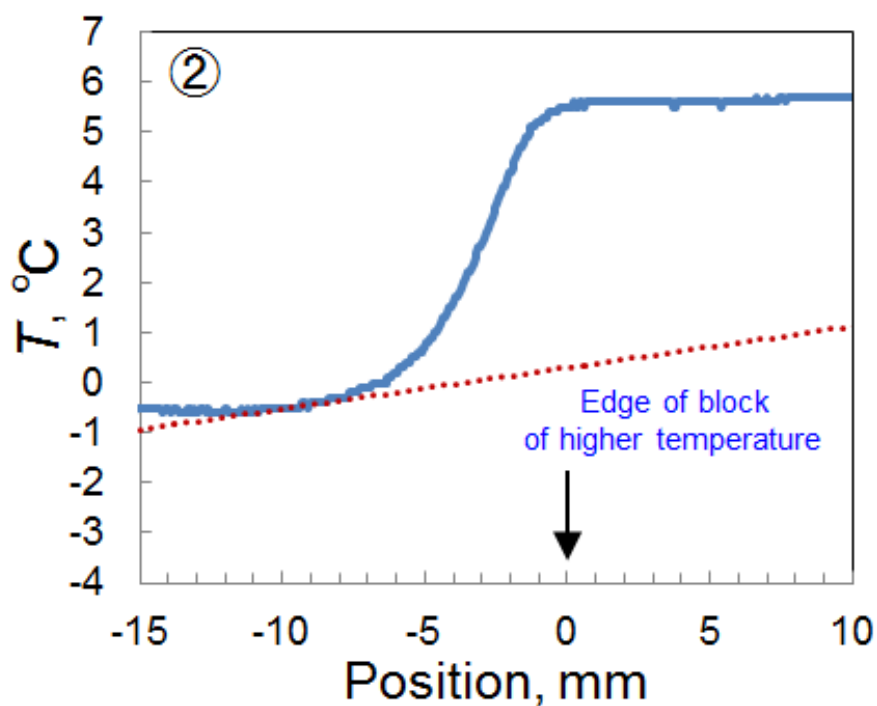
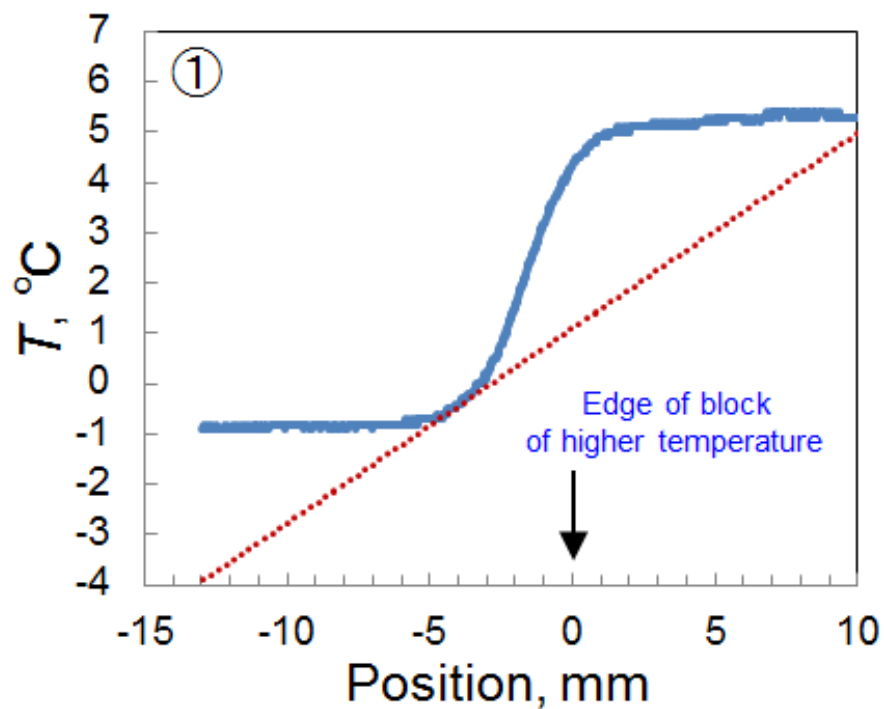
App.-fig. 10 Relation between set minimum temperature and measured minimum temperature of sample on DSS



App.-fig. 11 Temperature change of sample measured during cooling on DSS for observation of freezing behavior

	$T_{Hs}, ^\circ\text{C}$	$T_{Ls}, ^\circ\text{C}$	$G_s, ^\circ\text{C/mm}$	$G_{tc}, ^\circ\text{C/mm}$	$V, \text{mm/min}$	$H_{tc}, ^\circ\text{C/min}$	
①	5	-2	3.5	0.4	3.52	1.4	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 5px;"> <div style="width: 20px; height: 2px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> T_{tc} </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 20px; border-top: 1px dotted red; margin-right: 5px;"></div> Line by G_{tc} </div> </div>
②	5	-2	3.5	0.1	19.6	1.6	

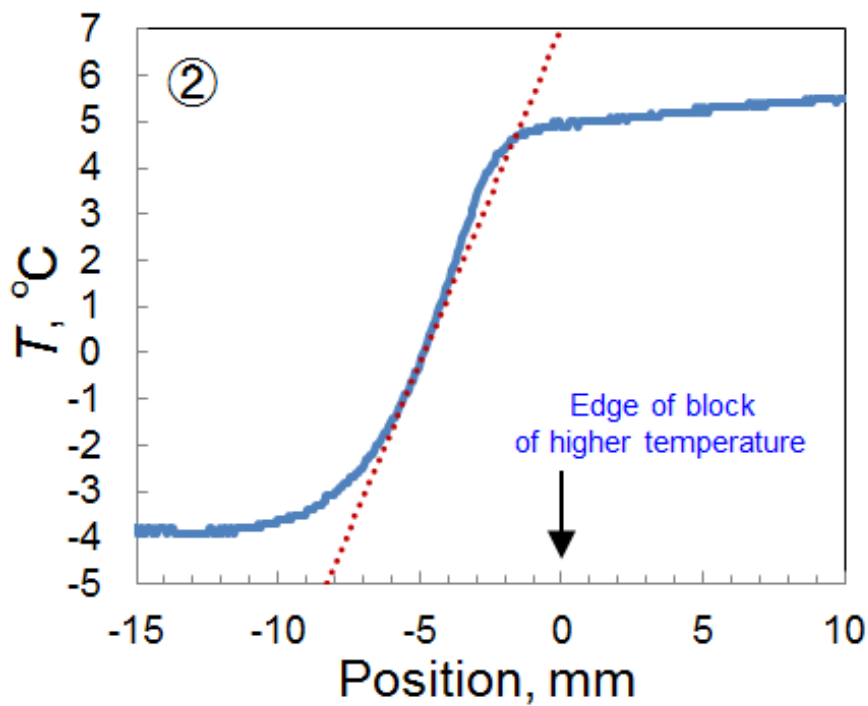
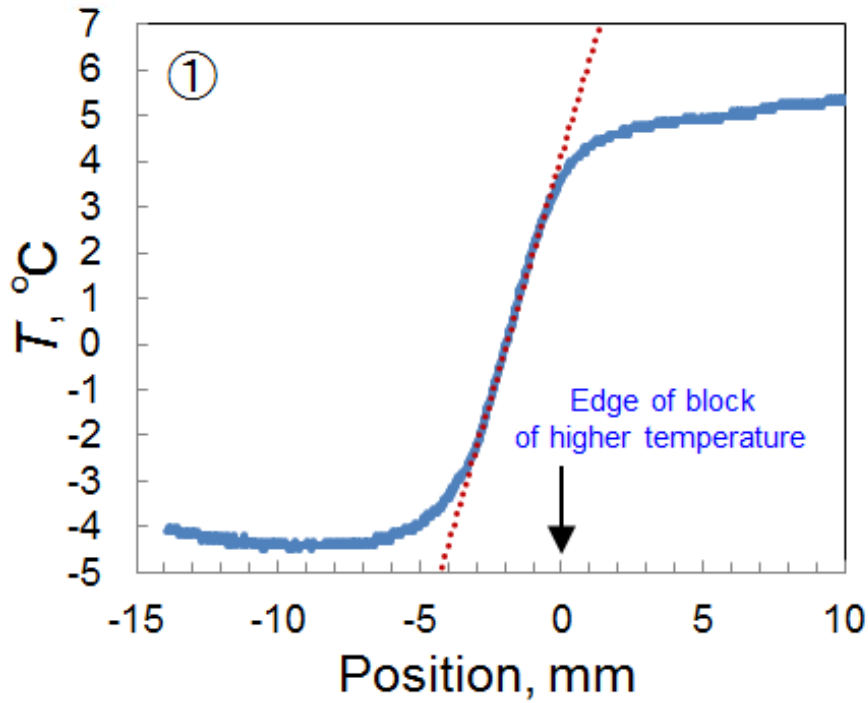
* $T_{Ltc} = -0.8^\circ\text{C}$



App.-fig. 12 Temperature change of sample measured during cooling on DSS for observation of morphological change and analysis of viability of post-thaw cells ($T_L = -0.8^\circ\text{C}$)

	$T_{Hs}, ^\circ\text{C}$	$T_{Ls}, ^\circ\text{C}$	$G_s, ^\circ\text{C/mm}$	$G_{tc}, ^\circ\text{C/mm}$	$V, \text{mm/min}$	$H_{tc}, ^\circ\text{C/min}$	
①	5	-5	5.0	2.1	2.56	5.5	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 20px; height: 2px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> T_{tc} </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 20px; border-top: 1px dotted red; margin-right: 5px;"></div> Line by G_{tc} </div>
②	5	-5	5.0	1.5	20.7	30.0	

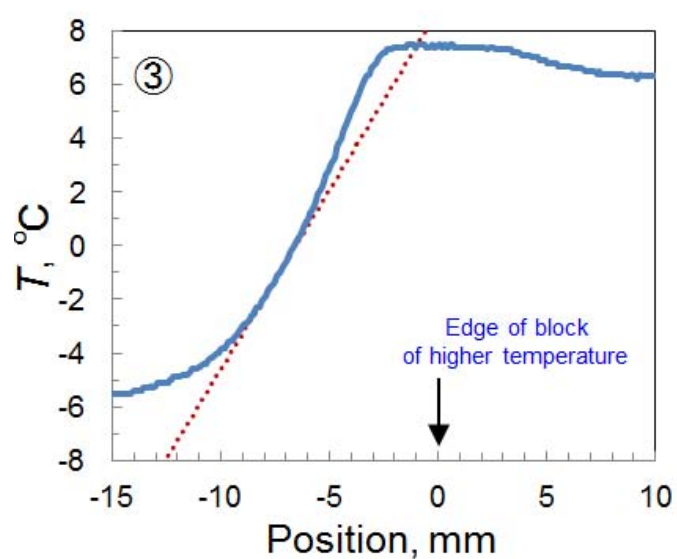
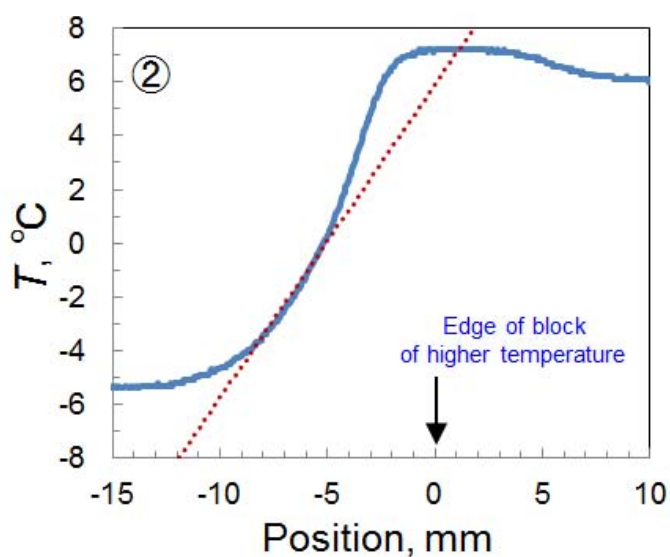
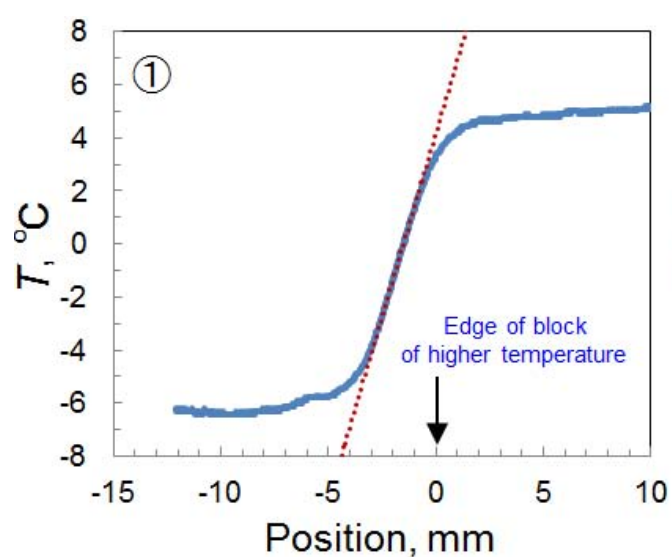
* $T_{Ltc} = -3.8^\circ\text{C}$



App.-fig. 13 Temperature change of sample measured during cooling on DSS for observation of morphological change and analysis of viability of post-thaw cells ($T_L = -3.8^\circ\text{C}$).

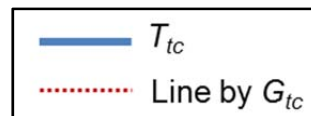
	$T_{Hs}, ^\circ\text{C}$	$T_{Ls}, ^\circ\text{C}$	$G_s, ^\circ\text{C/mm}$	$G_{tc}, ^\circ\text{C/mm}$	$V, \text{mm/min}$	$H_{tc}, ^\circ\text{C/min}$	
①	5	-7	6.0	2.8	1.97	5.5	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 5px;"> <div style="width: 20px; height: 5px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> T_{tc} </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 20px; border-top: 1px dotted red; margin-right: 5px;"></div> Line by G_{tc} </div> </div>
②	5	-7	6.0	1.2	17.2	20.0	
③	5	-7	6.0	1.33	28.0	37.5	

* $T_{Ltc} = -5.6^\circ\text{C}$

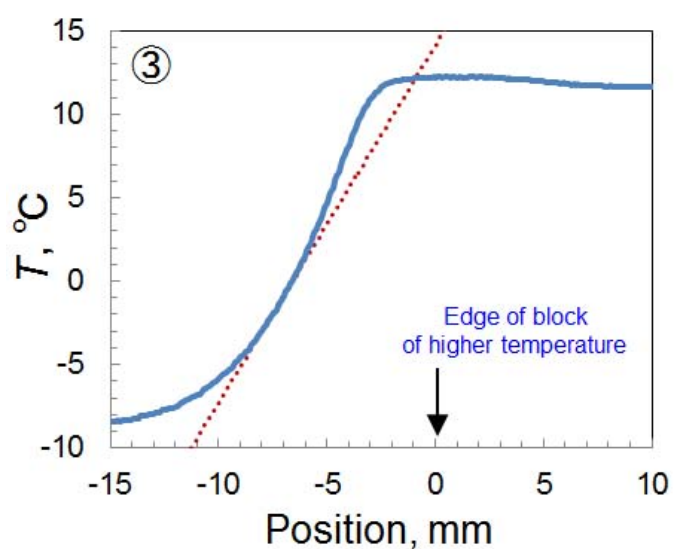
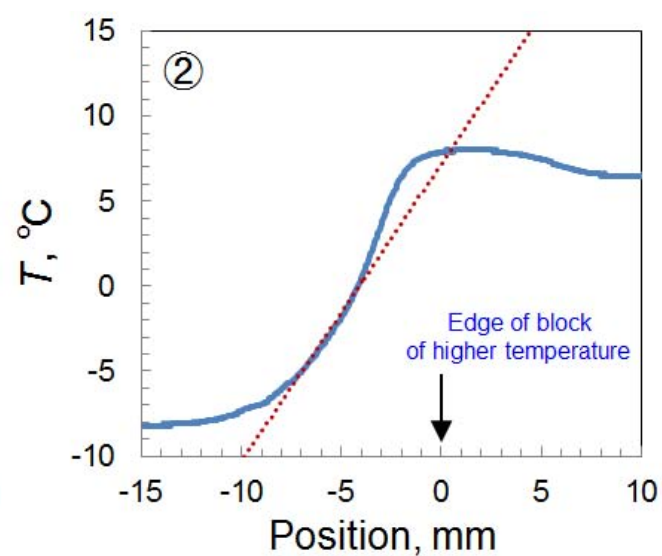
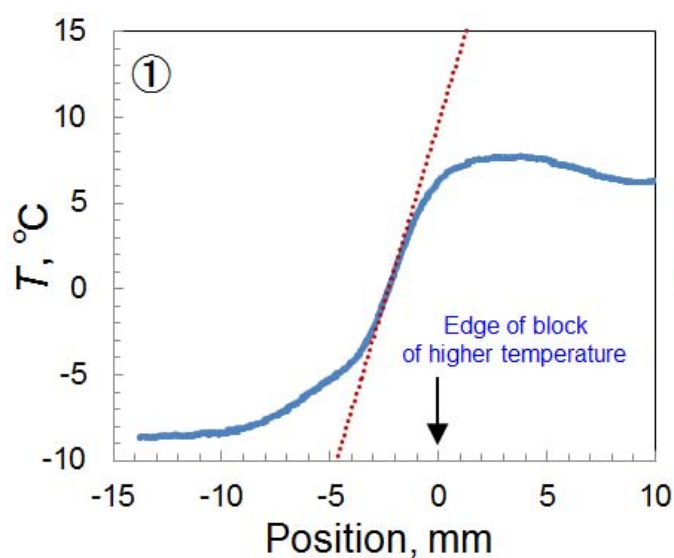


App.-fig. 14 Temperature change of sample measured during cooling on DSS for observation of morphological change and analysis of viability of post-thaw cells ($T_L = -5.6^\circ\text{C}$).

	$T_{Hs}, ^\circ\text{C}$	$T_{Ls}, ^\circ\text{C}$	$G_s, ^\circ\text{C/mm}$	$G_{tc}, ^\circ\text{C/mm}$	$V, \text{mm/min}$	$H_{tc}, ^\circ\text{C/min}$
①	5	-10	7.5	4.2	1.59	6.7
②	5	-10	7.5	1.7	13.73	24.0
③	10	-10	10.0	2.14	28.04	60.0

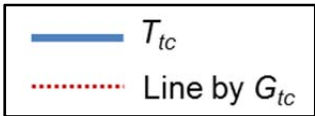


* $T_{Ltc} = -8.3^\circ\text{C}$

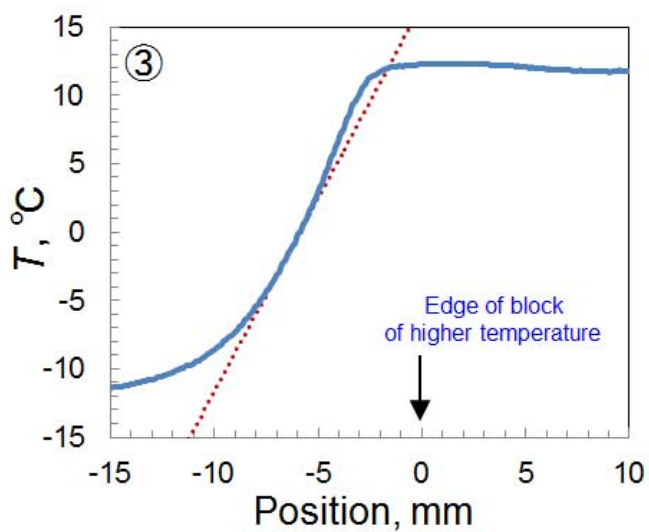
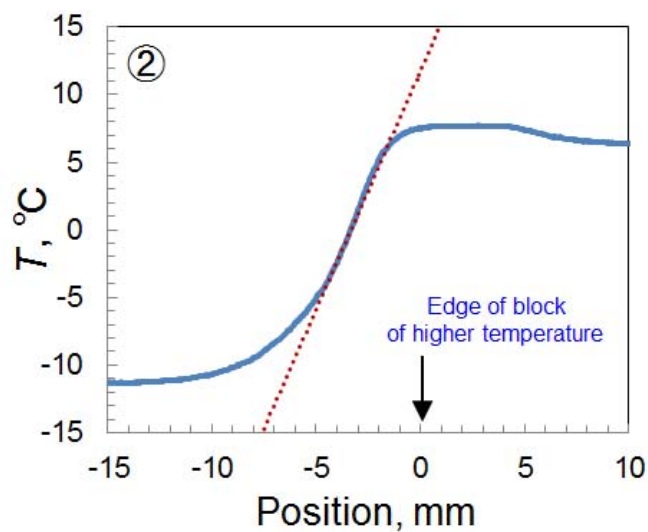
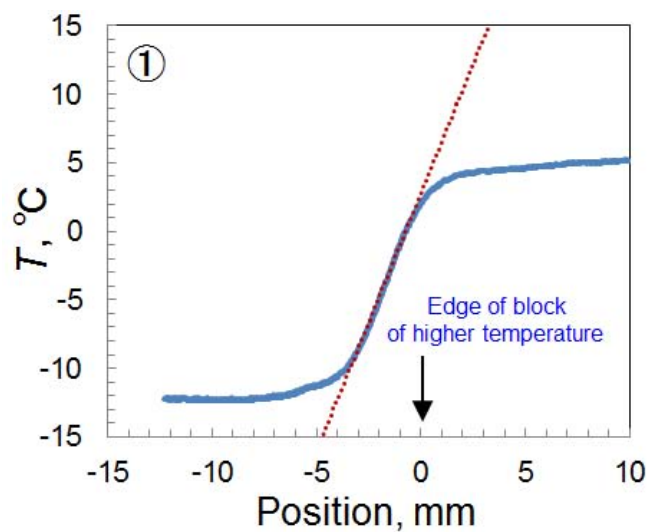


App.-fig. 15 Temperature change of sample measured during cooling on DSS for observation of morphological change and analysis of viability of post-thaw cells ($T_L = -8.3^\circ\text{C}$).

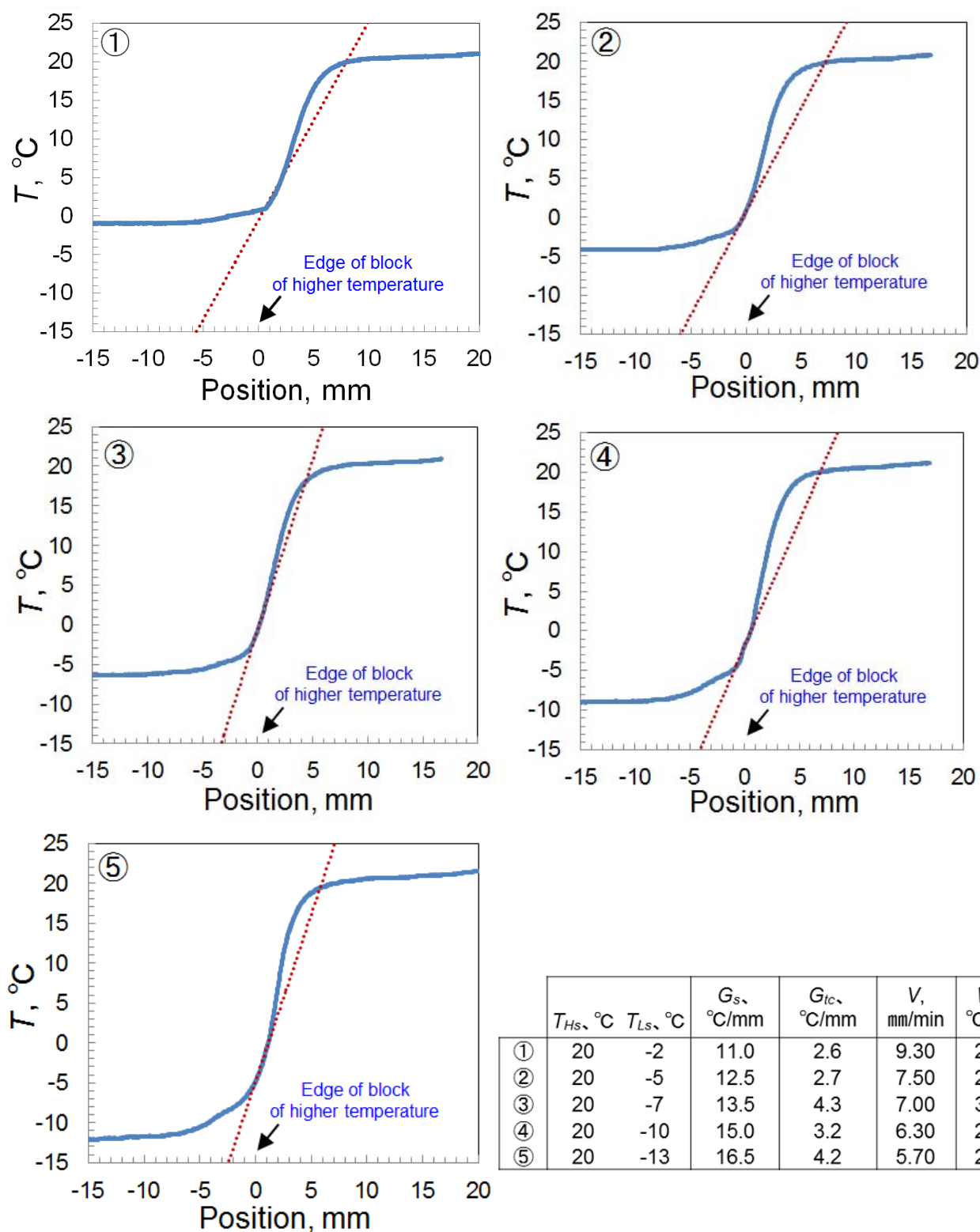
	$T_{Hs}, ^\circ\text{C}$	$T_{Ls}, ^\circ\text{C}$	$G_s, ^\circ\text{C/mm}$	$G_{tc}, ^\circ\text{C/mm}$	$V, \text{mm/min}$	$H_{tc}, ^\circ\text{C/min}$
①	5	-13	9.0	3.8	1.33	5.0
②	5	-13	9.0	3.5	11.37	40.0
③	10	-13	11.5	2.83	28.04	80.0



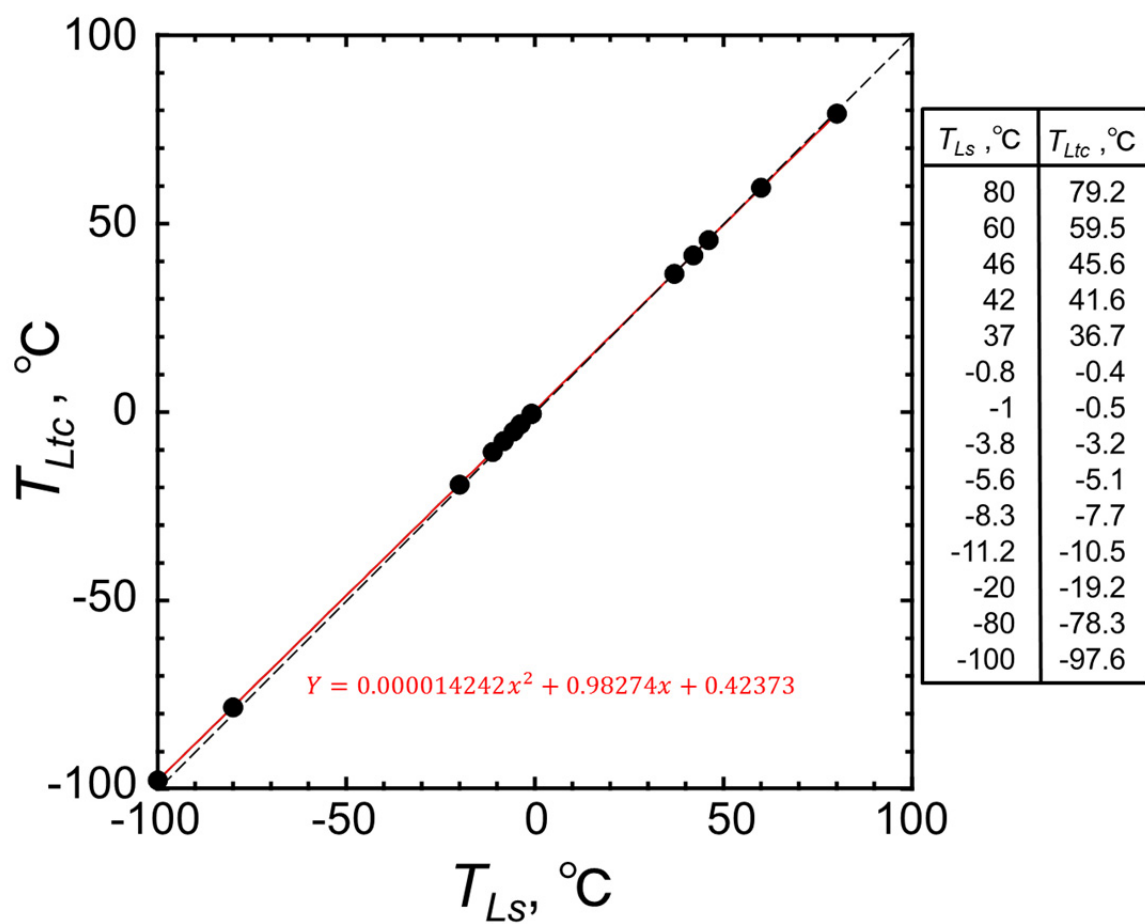
* $T_{Ltc} = -11.2^\circ\text{C}$



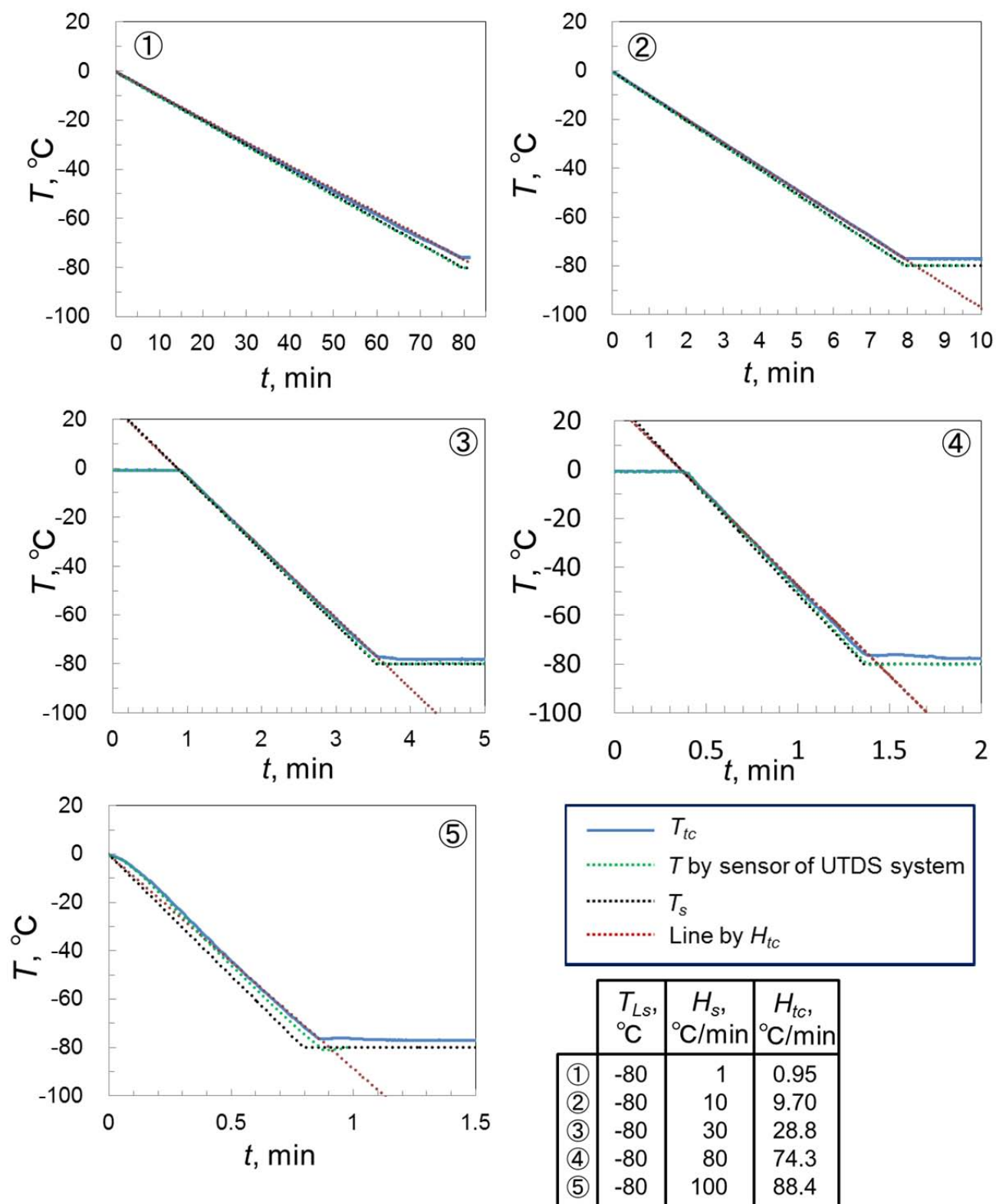
App.-fig. 16 Temperature change of sample measured during cooling on DSS for observation of morphological change and analysis of viability of post-thaw cells ($T_L = -11.2^\circ\text{C}$)



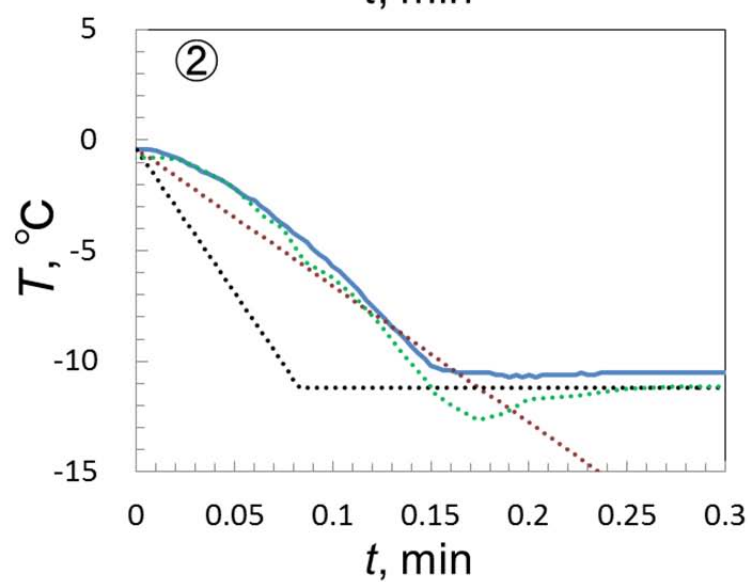
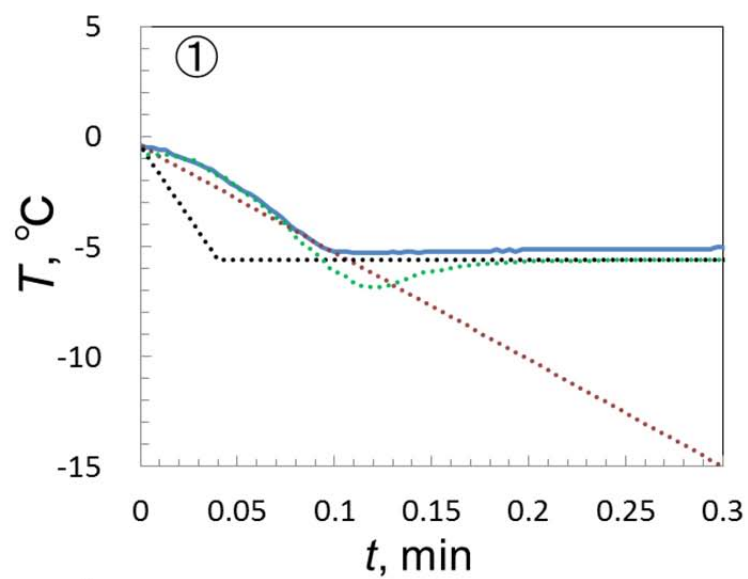
App.-fig. 17 Temperature change of sample measured during warming on DSS for observation of morphological change and analysis of viability of post-thaw cells.



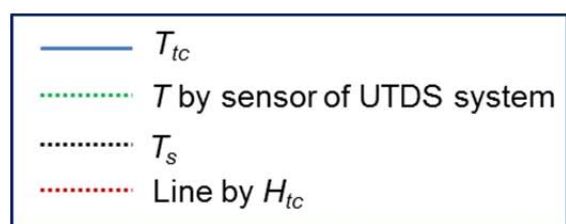
App.-fig. 18 Relation between set minimum temperature and measured minimum temperature of sample on UTDS.



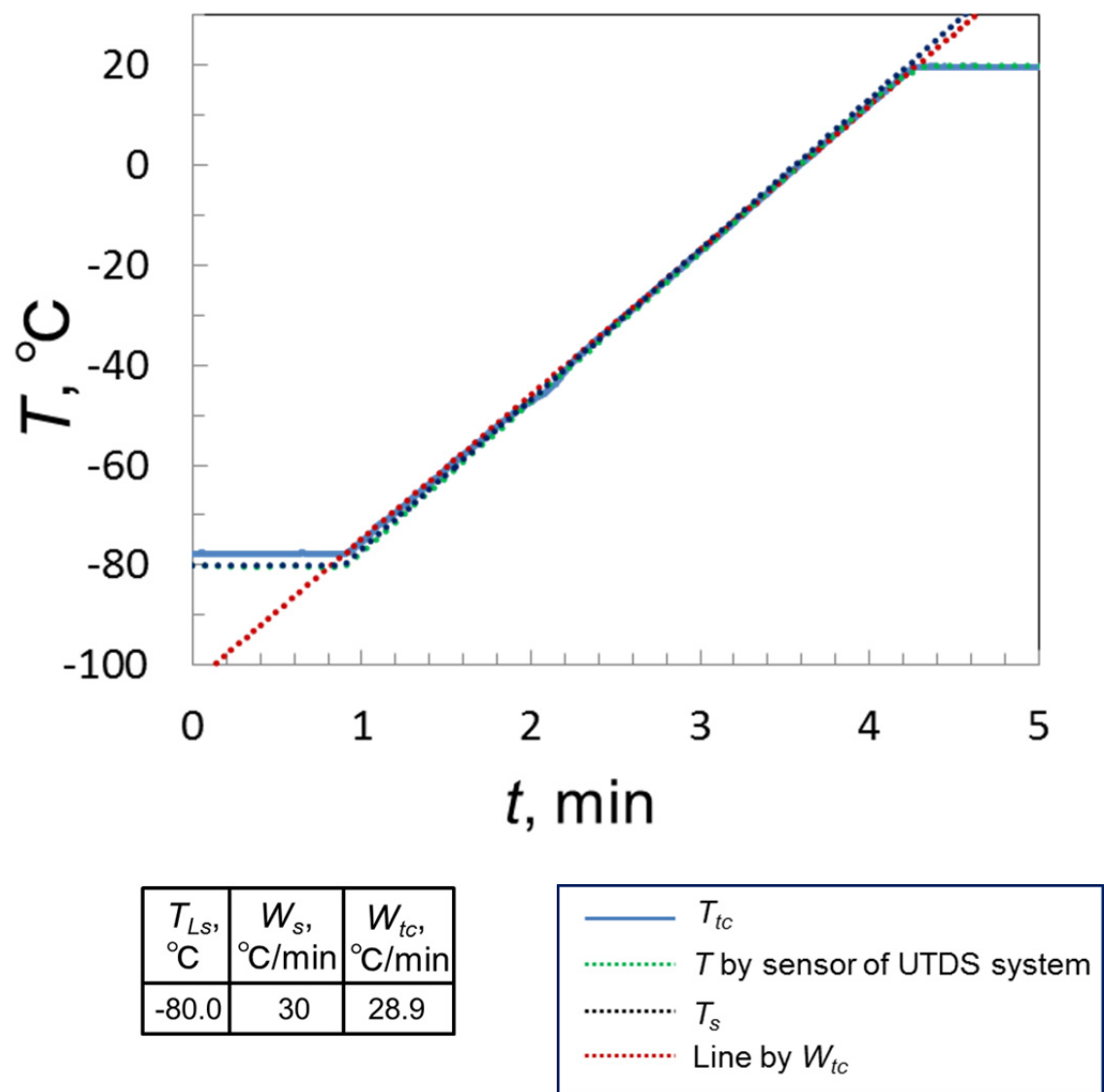
App.-fig. 19 Temperature change of sample measured during cooling on UTDS with various cooling rate at $T_L = -80^\circ\text{C}$.



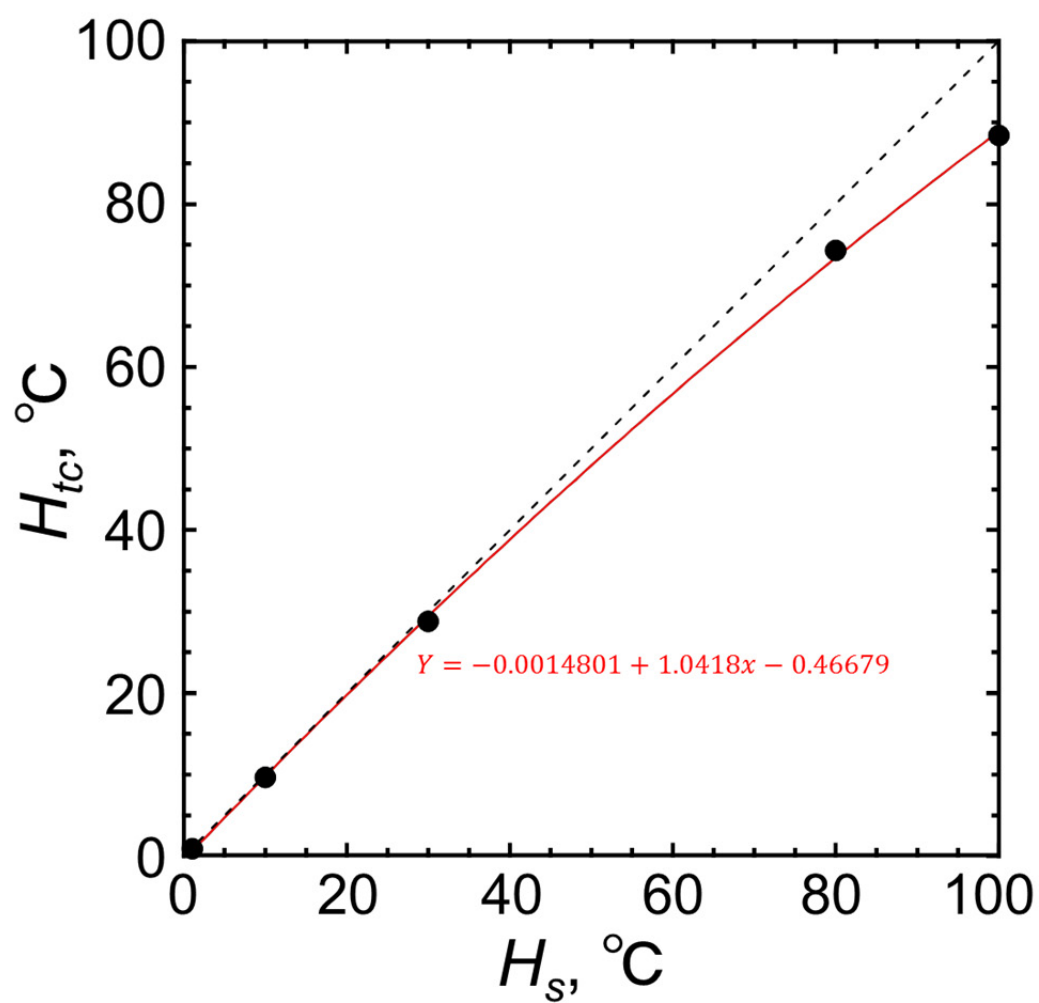
	$T_{LS},$ °C	$H_s,$ °C/min	$H_{tc},$ °C/min
①	-5.6	130	48.6
②	-11.2	130	61.8



App.-fig. 20 Temperature change of sample measured during cooling on UTDS with fastest cooling rate at higher minimum temperature



App.-fig. 21 Temperature change of sample measured during warming on UTDS



$T_{LS},$ °C	$H_S,$ °C/min	$H_{tc},$ °C/min
-80	1	0.95
-80	10	9.70
-80	30	28.8
-80	80	74.3
-80	100	88.4

App.-fig. 22 Relation between set cooling rate and measured cooling rate on UTDS

D. 神経線維の凍結保存

例えば、四肢の大きな挫滅創で末梢神経線維の束が切断・欠損した場合、そのまま放置しては、中枢側より再生してきた神経線維は末梢側へと導かれず、永久に神経の連続性は回復しない。切断端同士の距離が比較的短い場合は、神経線維束を包む膜同士を縫合（接合）することにより、末端側の軸索は脱落するものの、中枢側の軸索が末梢へ向かって再生し、再び感覚器官とシナプス結合する^(App.1)。しかし、欠損が大きく、切断端同士の距離が長く（ヒトでは約20mm以上）縫合が不可能な場合も多い。あるいは無理な操作を施して間隙を克服することがかえって悪い結果をもたらすような場合、例えば、張力が強くかかり過ぎ、知覚異常や痛みが残る場合もある。このような場合には、切断端の間に橋渡しが必要になる。19世紀末頃からこの目的のために種々の材料が用いられてきた。例えば、脱灰骨、血管、筋膜、ナイロン系などが挙げられる。しかし、橋渡しの材料としては、やはり神経線維自体を用いた場合に、最も軸索再生が促進されるという研究報告が大多数を占めるようになった^(App.2)。

橋渡しに用いる神経線維の供給源としては、これまで臨床的には、自家移植片がもっとも良いとされている。自家移植片は、拒絶反応を生じず、移植片採取後すぐに使えるため保存の必要もないからである。しかし、自家移植では、患者自身の神経採取による機能的傷害を考慮すると、適用範囲に限界がある。従って、神経再生を妨げる拒絶反応を効果的に抑制し、同種または異種移植によって、良好な神経線維の再生を得ることが望まれる。ここに神経移植に用いる神経線維の保存の必要性が生じる。

このような移植に用いる神経線維の凍結保存は、ネットワークの連続性を保ったまま凍結によりその機能を停止させ、後に機能を再び獲得させるための保存とはかなり趣を異にしている。というのは、移植される神経線維は、移植によりそれ自身が神経機能を発揮するのではなく、中枢切断端より再生する神経線維を末梢切断端にまで橋渡しをする役目を果たすものである。

Decherchi らは、ラットの手足から採取した神経線維を、50%の凍結保護物質を含む溶液でガラス化保存し、移植後、神経の再生が良好に補助されることを示した^(App.3)。また、林らは、ヒトへの臨床応用の前段階として、サルの尺骨神経を約10v/v%のグリセリンで緩速凍結保存・急速融解し、移植後の神経再生補助能が、非凍結の場合と同等であることを示したが、実験に使用したサルの頭数が少ないため（各群2頭ずつ）今後更なる検討が必要である^(App.4)。

【参考文献】

第1章

- (1.1) 根井外喜男, 阿曾弘一他編, “低温医学” (1983), 朝倉書店.
- (1.2) 朝比奈英三, 高橋恒夫, 酒井昭編, “凍結保存—動物・植物・微生物—” (1987), 朝倉書店.
- (1.3) Lovelock, J.E., “The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 10, No. 0 (1953), pp. 414-426.
- (1.4) Meryman, H.T. (2008). The Exceeding of a Minimum Tolerable Cell Volume in Hypertonic Suspension as a Cause of Freezing Injury. In *Ciba Foundation Symposium - The Frozen Cell* (John Wiley & Sons, Ltd.), pp. 51-67.
- (1.5) Nei, T., “Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures: II. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing”, *Cryobiology*, Vol. 4, No. 6 (1968), pp. 303-308.
- (1.6) Mazur, P., “Freezing of living cells: mechanisms and implications”, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Vol. 247, No. 3 (1984), pp. C125-C142.
- (1.7) Meryman, H.T., “Cryopreservation of living cells: principles and practice”, *Transfusion*, Vol. 47, No. 5 (2007), pp. 935-945.
- (1.8) Zhmakin, A.I., “Physical aspects of cryobiology”, *Physics-Uspekhi*, Vol. 51, No. 3 (2008), pp. 231-252.
- (1.9) Day, J. and Stacey, G., “Biobanking”, *Molecular Biotechnology*, Vol. 40, No. 2 (2008), pp. 202-213.
- (1.10) Bakhach, J., “The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues”, *Organogenesis*, Vol. 5, No. 3 (2009), pp. 119-126.
- (1.11) Ishiguro, H. and Rubinsky, B., “Mechanical Interactions between Ice Crystals and Red Blood Cells during Directional Solidification”, *Cryobiology*, Vol. 31, No. 5 (1994), pp. 483-500.
- (1.12) Ishiguro, H. and Horimizu, T., “Three-dimensional microscopic freezing and thawing behavior of biological tissues revealed by real-time imaging using confocal laser scanning microscopy”, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, Vol. 51, No. 23–24 (2008), pp. 5642-5649.
- (1.13) Holovati, J.L., Hannon, J.L., Gyongyossy-Issa, M.I.C. and Acker, J.P., “Blood Preservation Workshop: New and Emerging Trends in Research and Clinical Practice”, *Transfusion Medicine Reviews*, Vol. 23, No. 1 (2009), pp. 25-41.
- (1.14) Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M. and Critser, J.K., “The cryobiology of spermatozoa”, *Theriogenology*, Vol. 78, No. 8 (2012), pp. 1682-1699.

- (1.15) 桑山正成, “エビデンスに基づいた胚凍結保存”, 日本哺乳動物卵子学会誌, Vol. 22, No. 4 (2005), pp. 193-197.
- (1.16) Hunt, C.J., “Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review”, Transfusion Medicine and Hemotherapy, Vol. 38, No. 2 (2011), pp. 107-123.
- (1.17) 和田貴子, “重症熱傷症例とスキンバンク・皮膚培養”, 人工臓器, Vol. 37, No. 1 (2008), pp. 67-75.
- (1.18) Decherchi, P., Lammari-Barreault, N., Cochard, P., Carin, M., Réga, P., Pio, J., Péllissier, J.-F., Ladaïque, P., Novakovitch, G. and Gauthier, P., “CNS Axonal Regeneration within Peripheral Nerve Grafts Cryopreserved by Vitrification: Cytological and Functional Aspects”, Cryobiology, Vol. 34, No. 3 (1997), pp. 214-239.
- (1.19) 林淳也, “凍結保存同種神経移植--ニホンザル尺骨神経の研究”, 東京慈恵会医科大学雑誌, Vol. 123, No. 2 (2008), pp. 87-97.
- (1.20) Paynter, S.J., “Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells”, Brain Research Bulletin, Vol. 75, No. 1 (2008), pp. 1-14.
- (1.21) Fang, J. and Zhang, Z.-X., “Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat”, Cryobiology, Vol. 29, No. 2 (1992), pp. 267-273.
- (1.22) Kontur, P.J., Leranth, C., Redmond Jr, D.E., Roth, R.H. and Robbins, R.J., “Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity and Monoamine and Metabolite Levels in Cryopreserved Human Fetal Ventral Mesencephalon”, Experimental Neurology, Vol. 121, No. 2 (1993), pp. 172-180.
- (1.23) Das, G.D., Houle, J.D., Brasko, J. and Das, K.G., “Freezing of neural tissues and their transplantation in the brain of rats: technical details and histological observations”, Journal of Neuroscience Methods, Vol. 8, No. 1 (1983), pp. 1-15.
- (1.24) Mattson, M.P. and Kater, S.B., “Isolated hippocampal neurons in cryopreserved long-term cultures: Development of neuroarchitecture and sensitivity to NMDA”, International Journal of Developmental Neuroscience, Vol. 6, No. 5 (1988), pp. 439-452.
- (1.25) Hashimoto, A., Onodera, T., Ikeda, H. and Kitani, H., “Isolation and characterisation of fetal bovine brain cells in primary culture”, Research in Veterinary Science, Vol. 69, No. 1 (2000), pp. 39-46.
- (1.26) Silani, V., Pizzuti, A., Strada, O., Falini, A., Buscaglia, M. and Scarlato, G.,

- “Human neuronal cell viability demonstrated in culture after cryopreservation”, *Brain Research*, Vol. 473, No. 1 (1988), pp. 169-174.
- (1.27) Koopmans, J., HogenEsch, I., Copray, S., Middel, B., van Dijk, H., Go, K.G. and Staal, M., “Cryopreservation of Porcine Fetal Ventral Mesencephalic Tissue for Intrastriatal Transplantation in Parkinson's Disease”, *Cell Transplantation*, Vol. 10, No. 7 (2001), pp. 573-581.
 - (1.28) Dong, J.F., Detta, A. and Hitchcock, E.R., “Susceptibility of human foetal brain tissue to cool- and freeze-storage”, *Brain Research*, Vol. 621, No. 2 (1993), pp. 242-248.
 - (1.29) Kawamoto, J.C. and Barrett, J.N., “Cryopreservation of primary neurons for tissue culture”, *Brain Research*, Vol. 384, No. 1 (1986), pp. 84-93.
 - (1.30) Robbins, R.J., Torres-Aleman, I., Lebranth, C., Bradberry, C.W., Deutch, A.Y., Welsh, S., Roth, R.H., Spencer, D., Redmond, D.E., Jr. and Naftolin, F., “Cryopreservation of human brain tissue”, *Experimental Neurology*, Vol. 107, No. 3 (1990), pp. 208-213.
 - (1.31) Yoshimoto, Y., Date, I. and Ohmoto, T., “Improved cryopreservative medium suitable for the freeze-storage and transplantation of fetal neural tissues”, *Restorative Neurology and Neuroscience*, Vol. 6, No. 1 (1993), pp. 73-81.
 - (1.32) Sautter, J., Strecker, S., Kupsch, A. and Oertel, W.H., “Methylcellulose during cryopreservation of ventral mesencephalic tissue fragments fails to improve survival and function of cell suspension grafts”, *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 64, No. 2 (1996), pp. 173-179.
 - (1.33) Sauer, H., Frodl, E.M., Kupsch, A., Bruggencate, G. and Oertel, W.H., “Cryopreservation, survival and function of intrastriatal fetal mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease”, *Experimental Brain Research*, Vol. 90, No. 1 (1992), pp. 54-62.
 - (1.34) Collier, T.J., Gallagher, M.J. and Sladek, C.D., “Cryopreservation and storage of embryonic rat mesencephalic dopamine neurons for one year: comparison to fresh tissue in culture and neural grafts”, *Brain Research*, Vol. 623, No. 2 (1993), pp. 249-256.
 - (1.35) Collier, T.J., Eugene Redmond Jr, D., Sladek, C.D., Gallagher, M.J., Roth, R.H. and Sladek Jr, J.R., “Intracerebral grafting and culture of cryopreserved primate dopamine neurons”, *Brain Research*, Vol. 436, No. 2 (1987), pp. 363-366.
 - (1.36) Asahina, E., Shimada, K. and Hisada, Y., “A stable state of frozen protoplasm

- with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling”,
Experimental Cell Research, Vol. 59, No. 3 (1970), pp. 349-358.
- (1.37) Frodl, E.M., Duan, W.-M., Sauer, H.r., Kupsch, A. and Brundin, P., “Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant survival, morphology and function”, Brain Research, Vol. 647, No. 2 (1994), pp. 286-298.
- (1.38) Collier, T.J., Sladek, C.D., Gallagher, M.J., Blanchard, B.C., Daley, B.F., Foster, P.N., Redmond Jr, D.E., Roth, R.H. and Sladek Jr, J.R. (1988). Cryopreservation of fetal rat and non-human primate mesencephalic neurons: viability in culture and neural transplantation. In Progress in Brain Research, M.G. Don and R.S. John, eds. (Elsevier), pp. 631-636.
- (1.39) Frodl, E.M., Duan, W.M., Sauer, H., Kupsch, A. and Brundin, P., “Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant survival, morphology and function”, Brain Research, Vol. 647, No. 2 (1994), pp. 286-298.
- (1.40) Spencer, D.D., Robbins, R.J., Naftolin, F., Marek, K.L., Vollmer, T., Leranth, C., Roth, R.H., Price, L.H., Gjedde, A., Bunney, B.S., et al., “Unilateral Transplantation of Human Fetal Mesencephalic Tissue into the Caudate Nucleus of Patients with Parkinson's Disease”, New England Journal of Medicine, Vol. 327, No. 22 (1992), pp. 1541-1548.
- (1.41) Kordower, J.H., Rosenstein, J.M., Collier, T.J., Burke, M.A., Chen, E.Y., Li, J.M., Martel, L., Levey, A.E., Mufson, E.J., Freeman, T.B., et al., “Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies”, The Journal of Comparative Neurology, Vol. 370, No. 2 (1996), pp. 203-230.
- (1.42) Hagell, P., Schrag, A., Piccini, P., Jahanshahi, M., Brown, R., Rehnckrona, S., Widner, H., Brundin, P., Rothwell, J.C., Odin, P., et al., “Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: Effects of the second graft”, Brain, Vol. 122, No. 6 (1999), pp. 1121-1132.
- (1.43) Carvey, P.M., Ling, Z.D., Sortwell, C.E., Pitzer, M.R., McGuire, S.O., Storch, A. and Collier, T.J., “A Clonal Line of Mesencephalic Progenitor Cells Converted to Dopamine Neurons by Hematopoietic Cytokines: A Source of

- Cells for Transplantation in Parkinson's Disease”, *Experimental Neurology*, Vol. 171, No. 1 (2001), pp. 98-108.
- (1.44) Studer, L., Tabar, V. and McKay, R., “Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats”, *Nature Neuroscience*, Vol. 1, No. 4 (1998), pp. 290-295.
- (1.45) Espinosa-Jeffrey, A., Becker-Catania, S.G., Zhao, P.M., Cole, R., Edmond, J. and de Vellis, J., “Selective specification of CNS stem cells into oligodendroglial or neuronal cell lineage: Cell culture and transplant studies”, *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 69, No. 6 (2002), pp. 810-825.
- (1.46) Vescovi, A.L., Parati, E.A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frölichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A., et al., “Isolation and Cloning of Multipotential Stem Cells from the Embryonic Human CNS and Establishment of Transplantable Human Neural Stem Cell Lines by Epigenetic Stimulation”, *Experimental Neurology*, Vol. 156, No. 1 (1999), pp. 71-83.
- (1.47) Wennersten, A., Meijer, X., Holmin, S., Wahlberg, L. and Mathiesen, T., “Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury”, *Journal of Neurosurgery*, Vol. 100, No. 1 (2004), pp. 88-96.
- (1.48) Meissner, K.K., Kirkham, D.L. and Doering, L.C., “Transplants of neurosphere cell suspensions from aged mice are functional in the mouse model of Parkinson's”, *Brain Research*, Vol. 1057, No. 1–2 (2005), pp. 105-112.
- (1.49) Milosevic, J., Storch, A. and Schwarz, J., “Cryopreservation Does Not Affect Proliferation and Multipotency of Murine Neural Precursor Cells”, *Stem Cells*, Vol. 23, No. 5 (2005), pp. 681-688.
- (1.50) Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedenmann, B., Hescheler, J. and Wobus, A.M., “Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons”, *Mechanisms of Development*, Vol. 53, No. 2 (1995), pp. 275-287.
- (1.51) Hancock, C.R., Wetherington, J.P., Lambert, N.A. and Condie, B.G., “Neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 271, No. 2 (2000), pp. 418-421.
- (1.52) Björklund, L.M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y.C.,

- McNaught, K.S.P., Brownell, A.-L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.-S., et al., “Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 99, No. 4 (2002), pp. 2344-2349.
- (1.53) Ma, W., O'Shaughnessy, T. and Chang, E., “Cryopreservation of adherent neuronal networks”, *Neuroscience Letters*, Vol. 403, No. 1-2 (2006), pp. 84-89.
- (1.54) Malpique, R., Ehrhart, F., Katsen-Globa, A., Zimmermann, H. and Alves, P.M., “Cryopreservation of Adherent Cells: Strategies to Improve Cell Viability and Function After Thawing”, *Tissue Engineering Part C-Methods*, Vol. 15, No. 3 (2009), pp. 373-386.
- (1.55) Pichugin, Y., Fahy, G.M. and Morin, R., “Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification”, *Cryobiology*, Vol. 52, No. 2 (2006), pp. 228-240.

第 2 章

- (2.1) 北野宏明, “システムバイオロジー” (2001), 秀潤社.
- (2.2) 児玉龍彦, 仁科博道, “システム生物医学入門” (2005), 羊土社.
- (2.3) Alon, U., “An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits” (2006), Chapman & Hall/CRC press.
- (2.4) Diller, K.R., “Modeling of Bioheat Transfer Processes at High Temperature and Low Temperature”, *Advances in Heat Transfer*, Vol. 22: Bioengineering Heat Transfer, Y. I. Cho, ed. (1992), Academic Press.
- (2.5) Diller, K.R., Valvano, J.W. and Pearce, J.A., “Bioheat Transfer,” Section 4 Application of The CRC Handbook of Thermal Engineering, Kreith F., ed. (2000), CRC Press LLC.
- (2.6) He, X. and Bischof, J.C., “Quantification of Temperature and Injury Response in Thermal Therapy and Cryosurgery”, Vol. 31, No. 5&6 (2003), pp. 67.
- (2.7) Henriques, F.C. and Moritz, A.R., “Studies of Thermal Injury: I. The Conduction of Heat to and through Skin and the Temperatures Attained Therein. A Theoretical and an Experimental Investigation”, *American Journal of Pathology*, Vol. 23, No. 4 (1947), pp. 530-549.
- (2.8) Xu, Y. and Qian, R., “Analysis of Thermal Injury Process Based on Enzyme Deactivation Mechanisms”, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol. 117, No. 4 (1995), pp. 462-465.
- (2.9) Landry, J. and Marceau, N., “Rate-Limiting Events in Hyperthermic Cell

- Killing”, *Radiation Research*, Vol. 75, No. 3 (1978), pp. 573-585.
- (2.10) Moussa, N.A., Tell, E.N. and Cravalho, E.G., “Time Progression of Hemolysis of Erythrocyte Populations Exposed to Supraphysiological Temperatures”, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol. 101, No. 3 (1979), pp. 213-217.
 - (2.11) Jung, H., “A Generalized Concept for Cell Killing by Heat: Effect of Chronically Induced Thermotolerance”, *Radiation Research*, Vol. 127, No. 3 (1991), pp. 235-242.
 - (2.12) 石黒博, 野澤正和, “温熱ストレスによる細胞損傷・死滅の反応速度論的定式化に基づく数学モデルとその特性” (2009), 第46回日本伝熱シンポジウム講演論文集, pp.719-720.
 - (2.13) Ishiguro, H. and Nozawa, M., “Mathematical Modeling of Cell Damage and Death due to Hyperthermic Stress with Reaction Kinetic Formulation” (2008), *Proc. of the 2008 Summer Bioengineering Conference*, CD-ROM SBC2008-193014.
 - (2.14) Ishiguro, H. and Fukuda, K., “Experimental Characteristics and Reaction Kinetic Model of Cell Damage due to Hypertonic Electrolyte Solution” (2005), *Proc. of the 2005 Summer Bioengineering Conference*, CD-ROM.
 - (2.15) 石黒博, 野澤正和, “非定常一次元熱伝導加熱による温熱ストレスが誘起する生体内の細胞損傷・死滅の進行の予測” (2009), 日本機械学会熱工学コンファレンス 2009 講演論文集 No.09-33, pp.117-118.
 - (2.16) 石黒博, 野澤正和, “非定常温熱ストレスによる細胞損傷・死滅の予測 (反応速度論的数学モデルの適用)” (2009), 第46回日本伝熱シンポジウム講演論文集, pp.717-718.
 - (2.17) 石黒博, 野澤正和, “二つの死滅モードが共存する場合の細胞損傷・死滅の数学モデルの提案 (反応速度論的モデル化の適用)” (2010), 第47回日本伝熱シンポジウム講演論文集, pp.165-166.
 - (2.18) 石黒博, 野澤正和, “ストレス感受性が異なる二種類の細胞が共存する場合の細胞損傷・死滅の数学的モデル化” (2010), 日本機械学会熱工学コンファレンス 2010 講演論文集 No.10-25, pp.167-168.
 - (2.19) Pisu, M., Concas, A., Fadda, S., Cincotti, A. and Cao, G., “A simulation model for stem cells differentiation into specialized cells of non-connective tissues”, *Computational Biology and Chemistry*, Vol. 32, No. 5 (2008), pp. 338-344.
 - (2.20) Yakovlev, A.Y., Mayer-Proschel, M. and Noble, M., “A stochastic model of brain cell differentiation in tissue culture”, *Journal of Mathematical Biology*,

Vol. 37, No. 1 (1998), pp. 49-60.

- (2.21) Till, J.E., McCulloch, E.A. and Siminovitch, L., “A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 51, No. 1964, pp. 29-36.
- (2.22) Loeffler, M., Pantel, K., Wulff, H. and Wichmann, H.E., “A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part 1: Structure of the model”, *Cell and Tissue Kinetics*, Vol. 22, No. 1 (1989), pp. 13-30.
- (2.23) Britton, N.F., Wright, N.A. and Murray, J.D., “A mathematical model for cell population kinetics in the intestine”, *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 98, No. 3 (1982), pp. 531-541.
- (2.24) Mehr, R., Shahaf, G., Sah, A. and Cancro, M., “Asynchronous differentiation models explain bone marrow labeling kinetics and predict reflux between the pre - and immature B cell pools” , *International Immunology*, Vol. 15, No. 3 (2003), pp. 301-312.
- (2.25) Clement, F., Gruet, M.A., Monget, P., Terqui, M., Jolivet, E. and Monniaux, D., “Growth kinetics of the granulosa cell population in ovarian follicles: an approach by mathematical modelling”, *Cell Proliferation*, Vol. 30, No. 6-7 (1997), pp. 255-270.
- (2.26) Mary, J.Y., Valleron, A.J., Croizat, H. and Frindel, E., “Mathematical analysis of bone marrow erythropoiesis: application to C3H mouse data”, *Blood Cells*, Vol. 6, No. 2 (1980), pp. 241-262.
- (2.27) Tarbutt, R.G. and Blackett, N.M., “Cell population kinetics of the recognizable erythroid cells in the rat.”, *Cell Proliferation*, Vol. 1, No. 1 (1968), pp. 65-80.
- (2.28) Das, K.P., Freudenrich, T.M. and Mundy, W.R., “Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures”, *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 26, No. 3 (2004), pp. 397-406.
- (2.29) Torii, M.a., Matsuzaki, F., Osumi, N., Kaibuchi, K., Nakamura, S., Casarosa, S., Guillemot, F. and Nakafuku, M., “Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system”, *Development*, Vol. 126, No. 3 (1999), pp. 443-456.
- (2.30) Tsukada, Y., Chiba, K., Yamazaki, M. and Mohri, T., “Inhibition of the nerve growth factor-induced neurite outgrowth by specific tyrosine kinase and

- phospholipase inhibitors.”, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 17, No. 3 (1994), pp. 370-375.
- (2.31) Greene, L.A. and Tischler, A.S., “Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 73, No. 7 (1976), pp. 2424-2428.
- (2.32) Yamazaki, M., Chiba, K. and Mohri, T., “Differences in neuritogenic response to nitric oxide in PC12 and PC12h cells”, *Neuroscience Letters*, Vol. 393, No. 2-3 (2006), pp. 222-225.
- (2.33) Zheng, Y., Zhang, L., Lu, Q., Wang, X., Yu, F., Wang, X. and Lu, Q., “NGF-induced Tyro3 and Axl function as survival factors for differentiating PC12 cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 378, No. 3 (2009), pp. 371-375.
- (2.34) 梅田誠, 丹波章, 日本組織培養学会編, “組織培養の技術 基礎編 第三版” (1996), 朝倉書店.

第 3 章

- (3.1) Day, J. and Stacey, G., “Biobanking”, *Molecular Biotechnology*, Vol. 40, No. 2 (2008), pp. 202-213.
- (3.2) Bakhach, J., “The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues”, *Organogenesis*, Vol. 5, No. 3 (2009), pp. 119-126.
- (3.3) Meryman, H.T., “Cryopreservation of living cells: principles and practice”, *Transfusion*, Vol. 47, No. 5 (2007), pp. 935-945.
- (3.4) Zhmakin, A.I., “Physical aspects of cryobiology”, *Physics-Uspekhi*, Vol. 51, No. 3 (2008), pp. 231-252.
- (3.5) 石黒博, “生体, 医療における低温利用”, *日本機械学会誌*, Vol. 99, No. 927 (1996), pp. 107-110.
- (3.6) Ishiguro, H. and Rubinsky, B., “Mechanical Interactions between Ice Crystals and Red Blood Cells during Directional Solidification”, *Cryobiology*, Vol. 31, No. 5 (1994), pp. 483-500.
- (3.7) Ishiguro, H. and Horimizu, T., “Three-dimensional microscopic freezing and thawing behavior of biological tissues revealed by real-time imaging using confocal laser scanning microscopy”, *International Journal of Heat and Mass*

Transfer, Vol. 51, No. 23–24 (2008), pp. 5642-5649.

- (3.8) Frodl, E.M., Duan, W.M., Sauer, H., Kupsch, A. and Brundin, P., “Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant survival, morphology and function”, *Brain Research*, Vol. 647, No. 2 (1994), pp. 286-298.
- (3.9) Jensen, S., Sørensen, T., Møller, A.G. and Zimmer, J., “Intraocular grafts of fresh and freeze-stored rat hippocampal tissue: A comparison of survivability and histological and connective organization”, *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 227, No. 4 (1984), pp. 558-568.
- (3.10) Jensen, S., Sørensen, T. and Zimmer, J., “Cryopreservation of fetal rat brain tissue later used for intracerebral transplantation”, *Cryobiology*, Vol. 24, No. 2 (1987), pp. 120-134.
- (3.11) Uchida, T., Motomura, J., Nagayama, M. and Gohara, K., “Effects of Cooling Rate on Cryopreservation Conditions of Primary Rat Cortical Cells”, *Cryobiology and Cryotechnology*, Vol. 53, No. 2 (2007), pp. 161-166.
- (3.12) Rukenstein, A. and Greene, L.A., “The quantitative bioassay of nerve growth factor: use of frozen ‘primed’ PC12 pheochromocytoma cells”, *Brain Research*, Vol. 263, No. 1 (1983), pp. 177-180.
- (3.13) Paynter, S.J., “Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells”, *Brain Research Bulletin*, Vol. 75, No. 1 (2008), pp. 1-14.
- (3.14) Ma, W., O’Shaughnessy, T. and Chang, E., “Cryopreservation of adherent neuronal networks”, *Neuroscience Letters*, Vol. 403, No. 1-2 (2006), pp. 84-89.
- (3.15) Malpique, R., Ehrhart, F., Katsen-Globa, A., Zimmermann, H. and Alves, P.M., “Cryopreservation of Adherent Cells: Strategies to Improve Cell Viability and Function After Thawing”, *Tissue Engineering Part C-Methods*, Vol. 15, No. 3 (2009), pp. 373-386.
- (3.16) Pichugin, Y., Fahy, G.M. and Morin, R., “Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification”, *Cryobiology*, Vol. 52, No. 2 (2006), pp. 228-240.
- (3.17) 小川文也, “日本低温医学会認定第4回凍結手術専門医講習会テキスト” (2013), 日本低温医学会編.
- (3.18) Rubinsky, B. and DeVries, A.L., “Effect of ice crystal habit on the viability of glycerol-protected red blood cells”, *Cryobiology*, Vol. 26, No. 6 (1989), pp. 580.
- (3.19) Javois, L.C., “Immunocytochemical methods and protocols, second ed.”, Vol

- 115 (1999), New York.
- (3.20) Lovelock, J.E., “The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 10, No. 0 (1953), pp. 414-426.
 - (3.21) Meryman, H.T. (2008). The Exceeding of a Minimum Tolerable Cell Volume in Hypertonic Suspension as a Cause of Freezing Injury. In *Ciba Foundation Symposium - The Frozen Cell* (John Wiley & Sons, Ltd.), pp. 51-67.
 - (3.22) Nei, T., “Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures: II. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing”, *Cryobiology*, Vol. 4, No. 6 (1968), pp. 303-308.
 - (3.23) Mazur, P., “Freezing of living cells: mechanisms and implications”, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Vol. 247, No. 3 (1984), pp. C125-C142.
 - (3.24) 根井外喜男, 阿曾弘一他編, “低温医学” (1983), 朝倉書店.
 - (3.25) 朝比奈英三, 高橋恒夫, 酒井昭編, “凍結保存—動物・植物・微生物—” (1987), 朝倉書店.
 - (3.26) Fujikawa, S., “The effect of various cooling rates on the membrane ultrastructure of frozen human erythrocytes and its relation to the extent of haemolysis after thawing”, *Journal of Cell Science*, Vol. 49, No. 1 (1981), pp. 369-382.
 - (3.27) Sherman, J.K., “Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice”, *The Anatomical Record*, Vol. 144, No. 3 (1962), pp. 171-189.
 - (3.28) Asahina, E., Shimada, K. and Hisada, Y., “A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling”, *Experimental Cell Research*, Vol. 59, No. 3 (1970), pp. 349-358.
 - (3.29) Nei, T., “Growth of ice crystals in frozen specimens”, *Journal of Microscopy*, Vol. 99, No. 2 (1973), pp. 227-233.
 - (3.30) 平野朝雄, 富安斉, “神経病理を学ぶ人のために 第4版” (2003), 医学書院.
 - (3.31) Maxwell, W.L., “Histopathological changes at central nodes of Ranvier after stretch-injury”, *Microscopy Research and Technique*, Vol. 34, No. 6 (1996), pp. 522-535.
 - (3.32) Kilinc, D., Gallo, G. and Barbee, K.A., “Mechanically-induced membrane poration causes axonal beading and localized cytoskeletal damage”,

- Experimental Neurology, Vol. 212, No. 2 (2008), pp. 422-430.
- (3.33) Maxwell, W.L. and Graham, D.I., "Loss of axonal microtubules and neurofilaments after stretch-injury to guinea pig optic nerve fibers", *Journal of Neurotrauma*, Vol. 14, No. 9 (1997), pp. 603-614.
 - (3.34) Bäurle, J. and Grüsser-Cornehls, U., "Axonal torpedoes in cerebellar Purkinje cells of two normal mouse strains during aging", *Acta Neuropathologica*, Vol. 88, No. 3 (1994), pp. 237-245.
 - (3.35) Pike, C.J., Cummings, B.J. and Cotman, C.W., "beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology", *Neuroreport*, Vol. 3, No. 9 (1992), pp. 769-772.
 - (3.36) Budde, M.D. and Frank, J.A., "Neurite beading is sufficient to decrease the apparent diffusion coefficient after ischemic stroke", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 107, No. 32 (2010), pp. 14472-14477.
 - (3.37) Markin, V.S., Tanelian, D.L., Jersild Jr, R.A. and Ochs, S., "Biomechanics of Stretch-Induced Beading", *Biophysical Journal*, Vol. 76, No. 5 (1999), pp. 2852-2860.
 - (3.38) Shannon, P., Smith, C.R., Deck, J., Ang, L.C., Ho, M. and Becker, L., "Axonal injury and the neuropathology of shaken baby syndrome", *Acta Neuropathologica*, Vol. 95, No. 6 (1998), pp. 625-631.
 - (3.39) Tang-Schomer, M.D., Patel, A.R., Baas, P.W. and Smith, D.H., "Mechanical breaking of microtubules in axons during dynamic stretch injury underlies delayed elasticity, microtubule disassembly, and axon degeneration", *The FASEB Journal*, Vol. 24, No. 5 (2010), pp. 1401-1410.
 - (3.40) Johnson, V.E., Stewart, W. and Smith, D.H., "Axonal pathology in traumatic brain injury", *Experimental Neurology*, Vol. 246, No. 0 (2013), pp. 35-43.
 - (3.41) Schirmer, L., Merkler, D., König, F.B., Brück, W. and Stadelmann, C., "Neuroaxonal Regeneration is More Pronounced in Early Multiple Sclerosis than in Traumatic Brain Injury Lesions", *Brain Pathology*, Vol. 23, No. 1 (2013), pp. 2-12.
 - (3.42) Al-Noori, S. and Swann, J.W., "A role for sodium and chloride in kainic acid-induced beading of inhibitory interneuron dendrites", *Neuroscience*, Vol. 101, No. 2 (2000), pp. 337-348.
 - (3.43) Sayas, C.L., Moreno-Flores, M.T., Avila, J. and Wandosell, F., "The Neurite Retraction Induced by Lysophosphatidic Acid Increases Alzheimer's

- Disease-like Tau Phosphorylation”, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. 52 (1999), pp. 37046-37052.
- (3.44) Nakayama, Y., Aoki, Y. and Niitsu, H., “Studies on the Mechanisms Responsible for the Formation of Focal Swellings on Neuronal Processes Using a Novel In Vitro Model of Axonal Injury”, *Journal of Neurotrauma*, Vol. 18, No. 5 (2001), pp. 545-554.
- (3.45) Joshi, H.C., Chu, D., Buxbaum, R.E. and Heidemann, S.R., “Tension and compression in the cytoskeleton of PC 12 neurites”, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 101, No. 3 (1985), pp. 697-705.
- (3.46) Ochs, S., Pourmand, R., Jersild Jr, R.A. and Friedman, R.N., “The origin and nature of beading: A reversible transformation of the shape of nerve fibers”, *Progress in Neurobiology*, Vol. 52, No. 5 (1997), pp. 391-426.
- (3.47) Beirowski, B., Nogradi, A., Babetto, E., Garcia-Alias, G. and Coleman, M.P., “Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration”, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol. 69, No. 5 (2010), pp. 455-472.
- (3.48) Souzu, H. and Mazur, P., “Temperature dependence of the survival of human erythrocytes frozen slowly in various concentrations of glycerol”, *Biophysical Journal*, Vol. 23, No. 1 (1978), pp. 89-100.

第 4 章

- (4.1) (1.53)を参照.
- (4.2) (1.23)を参照.
- (4.3) (1.24)を参照.
- (4.4) (1.25)を参照.
- (4.5) (1.21)を参照.
- (4.6) (1.26)を参照.
- (4.7) (1.2)を参照.
- (4.8) Grilli, G., Porcellini, A. and Lucarelli, G., “Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells”, *Cryobiology*, Vol. 17, No. 5 (1980), pp. 516-520.
- (4.9) Choi, J. and Bischof, J.C., “Cooling rate dependent biophysical and viability response shift with attachment state in human dermal fibroblast cells”, *Cryobiology*, Vol. 63, No. 3 (2011), pp. 285-291.

(4.10) (1.54)を参照.

(4.11) (1.55)を参照.

付録

(App.1) Canale, S.T. and Campbell, W.C., “末梢神経損傷 マイクロサージャリー
(藤井克之総監訳)”, Vol 8 (2003), エルゼビア・ジャパン.

(App.2) 諸富武文, 平沢泰介, 阿曾弘一他編, “低温医学” (1983), 朝倉書店.

(App.3) (1.18)を参照.

(App.4) (1.19)を参照.

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、指導教官である、九州工業大学生命体工学研究科・石黒博教授には、研究の進め方やものの考え方など研究全般にわたって、終始、懇切丁寧なご指導を頂き、学会など研究成果を発表する場にも多数参加させて頂きました。また、研究に集中できるよう様々な面からサポートもして頂き、心より感謝いたします。

実験材料である PC12 細胞の培養方法について、北陸大学薬学部・千葉賢三准教授より多くの詳細なご指導やご意見を賜りました。また、神経突起の形態変化の形成メカニズムに関して、日本獣医生命科学大学獣医保健看護学科・神谷新司教授、および、梶ヶ谷博教授から、貴重な情報やご意見を頂きました。これら三人の先生方にも、深く感謝申し上げます。

論文審査を務めていただいた九州大学大学院農学研究院・井上眞理教授、九州工業大学生命体工学研究科・山田宏教授、および、玉川雅章教授からは、本論文をまとめるにあたり、貴重なご意見やご指摘を頂き、厚くお礼申し上げます。

日々の研究生活において、様々な面から心強い支援や協力をしてくれた、石黒研究室の後輩の諸氏に深く感謝します。

最後に、学位取得に関して理解を示し、これまで忍耐強く支援や励ましを続けてくれた、両親や家族の皆に心より深謝します。